

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN05/000408

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN
Number: 200410032158.3
Filing date: 01 April 2004 (01.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 May 2005 (24.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2004.04.01

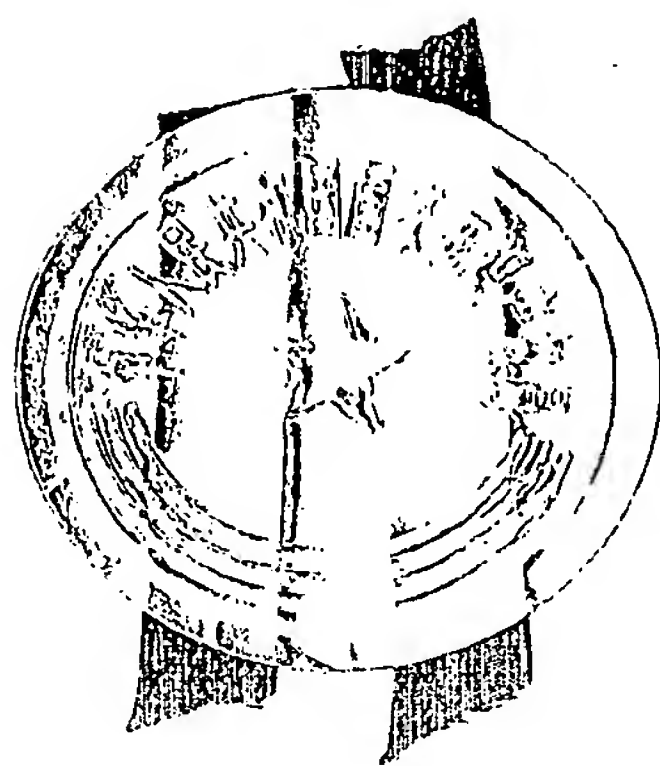
申 请 号: 200410032158.3

申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 基因工程重组抗C E A 抗C D 3 抗C D 2 8 单链三特异
抗体

申 请 人: 北京安波特基因工程技术有限公司

发明人或设计人: 王祥斌、黄华樑、赵宝峰、赵琦、朴锦华、林晴



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2005 年 4 月 12 日

权 利 要 求 书

1. 一种单链三特异抗体, 其特征在于由抗肿瘤相关抗原的抗体、FC 连接肽、抗人 CD3 抗体、HSA 连接肽、抗人 CD28 抗体依次连接而成。
- 5 2. 权利要求 1 所述的单链三特异抗体, 其中所述抗肿瘤相关抗原的抗体、抗人 CD3 抗体、抗人 CD28 抗体可以为单链抗体片段、抗体 Fab 片段或单域抗体片段。
3. 权利要求 1 所述的单链三特异抗体, 其特征在于所述单链三特异抗体的 C 末端具有 c-myc 标签和/或组氨酸标签。
- 10 4. 权利要求 1 所述的单链三特异抗体, 其中所述肿瘤相关抗原是癌胚抗原。
5. 权利要求 1 所述的单链三特异抗体, 其是由抗癌胚抗原单链抗体、FC 连接肽、抗人 CD3 单链抗体、HSA 连接肽和抗 CD28 抗体重链片段依次连接构成的 CEA-TsAb, 具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
- 15 6. 一段 DNA 序列, 其特征在于编码权利要求 1—5 任一项的单链三特异抗体。
7. 权利要求 6 的 DNA 序列, 其是编码权利要求 5 的单链三特异抗体的 DNA 序列, 具有 SEQ ID NO: 3 所示的核苷酸序列,。
8. 权利要求 5 的单链三特异抗体, 其特征在于所述抗癌胚抗原单链抗体具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
- 20 9. 权利要求 5 的单链三特异抗体, 其特征在于所述抗人 CD3 单链抗体具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
9. 一种表达载体, 其特征在于含有权利要求 6 或 7 的 DNA 序列。
10. 权利要求 9 的表达载体, 其是 CEA-TsAb/pTRI。
- 25 11. 一种宿主细胞, 其特征在于含有权利要求 9 的表达载体。
12. 权利要求 11 的宿主细胞, 其是大肠杆菌。
13. 一种促进单链三特异抗体胞内可溶表达的方法, 其特征在于将处于对数生长期的含编码所述单链三特异抗体的 DNA 序列的宿主细胞用 IPTG 于 30℃ 诱导表达, 所述 IPTG 的终浓度为 0.4mmol/ml。
- 30 14. 权利要求 13 的方法, 其中所述宿主细胞是含权利要求 10 的

1040179

CEA-TsAb/pTRI 的大肠杆菌 BL21。

15. 一种纯化单链三特异抗体的方法，其特征在于用 DEAE 阴离子交换树脂纯化用权利要求 13 的方法获得的单链三特异抗体。

16. 一种用于治疗或预防肿瘤的药物组合物，其特征在于包含权利要求 5 1-5 任一项的单链三特异抗体和药用载体。

17. 权利要求 16 的药物组合物，其中所述肿瘤为表达癌胚抗原的肿瘤。

18. 权利要求 1-5 任一项的单链三特异抗体在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的应用。

19. 权利要求 18 的应用，其中所述肿瘤为表达癌胚抗原的肿瘤。

10

15

20

25

30

基因工程重组抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 单链三特异抗体

5

技术领域

本发明涉及基因工程抗体领域，更具体地，涉及一种基因工程重组抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 单链三特异抗体；这种抗体的构建、表达和纯化方法；含有该抗体的载体和大肠杆菌宿主菌。

10

背景技术

在人体内，T 细胞的活化需要双信号传递途径的作用：抗原呈递细胞（APC: Antigen Presenting Cells）表面的 MHC/抗原肽复合物与 T 细胞表达的 TCR/CD3 复合物相互作用，产生第一信号传递途径；而 APC 细胞表面的辅刺激信号分子受体（如 B7）与 T 细胞表面的辅刺激信号分子（如 CD28）相互作用，产生第二信号，即辅刺激信号传递途径。一般认为，仅存在第一信号，不能充分活化 T 细胞（Baxter & Hodgkin, 2002; Bernard et al., 2002）。

T 细胞主要包括两类：杀伤性 T 淋巴细胞（CTL: Cytotoxic T Lymphocytes）和辅助性 T 细胞（TH: T help cells）。其中 CTL 细胞是细胞免疫的主要效应细胞，而 TH 细胞通过分泌细胞因子（如 IL-2 等）和细胞之间的直接相互作用，调节 CTL 细胞的活性，间接参与细胞免疫。由于肿瘤免疫主要以细胞免疫为主，因此以特异活化 CTL 细胞为目的设计抗肿瘤药物是进行肿瘤免疫治疗的重要途径。（Foss, 2002）

目前人们针对 T 细胞活化的第一信号途径，设计并构建了一系列基因工程抗肿瘤抗 CD3 双特异抗体，其中相当一部分已经进入临床实验（Daniel et al., 1998; Holliger et al., 1999; Loffler et al., 2000; Manzke et al., 2001; Manzke et al., 2001; Dreier et al., 2002; Dreier et al., 2003; Loffler et al., 2003; Min Fang, 2003; Fang et al., 2004）。已有的实验数据已经表明，该类双特异

抗体能够通过特异活化识别肿瘤细胞的 T 淋巴细胞, 间接特异杀伤肿瘤细胞。然而由于仅有第一信号传递途径, 还不足以完全活化 T 淋巴细胞, 甚至可能诱导 T 淋巴细胞产生激活诱导的细胞死亡 (AICD: activation induced cell death) 现象, 从而降低杀伤肿瘤细胞的作用效果 (Daniel et al., 1998)。

为了克服该种双特异抗体的缺点, 人们设计构建了另外一种双特异抗体: 抗肿瘤抗 CD28 双特异抗体。将其与抗肿瘤抗 CD3 双特异抗体两种双特异抗体联合使用, 就可以为 T 细胞活化提供完整的双信号途径 (Jung et al., 2001; Kodama et al., 2002)。实验证明, 这样做能大幅度提高杀伤肿瘤细胞的效率。然而两种双特异抗体联合使用的方式, 在具体应用上会带来一系列不便, 如增加了表达和纯化的操作工序和生产成本, 临床应用时必须考虑两种抗体的相对比例等。因此, 如果构建一种同时针对三种抗原 (肿瘤抗原、CD3 或 TCR、CD28) 的三特异抗体 (TsAb: tri-specific antibody) 分子, 那么该三特异抗体分子将具有上述两种双特异抗体分子的特性, 并且在表达、纯化和临床应用中将具有更大的优越性。

三特异抗体有以下三种类型, 化学偶联型 (Jung et al., 1991; Tutt et al., 1991; French, 1998; Wong et al., 2000)、基因工程多聚体型 (Atwell et al., 1999; Dolezal et al., 2000; Schoonjans et al., 2000; Schoonjans et al., 2000; Kortt et al., 2001; Schoonjans et al., 2001; Willems et al., 2003) 和基因工程单链融合分子型 (Song et al., 2003; Zhang et al., 2003)。其中第三种类型的三特异抗体的构建方式简单, 表达产物单一, 易于纯化, 因此具有更好的应用前景。采用该种方式, 本发明人已经成功构建了一种基因工程抗卵巢癌抗 CD3 抗 CD28 单链三特异抗体 (Song et al., 2003; Zhang et al., 2003), 并且已经证明能够在体外介导产生卵巢癌细胞特异的杀伤作用。由于癌胚抗原—CEA (carcinoma embryonic antigen) 是广谱的肿瘤相关抗原 (Shi et al., 1983; Ganjei et al., 1988; Horie et al., 1996; Kuo et al., 1996; Feil et al., 1999; Tomita et al., 2000; Kammerer et al., 2003), 用其抗体构建单链三特异抗体将可应用于多种肿瘤的预防和治疗。

发明内容

发明概述

本发明将广谱的肿瘤相关抗原：CEA 引入三特异抗体的构建，构建抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 基因工程单链三特异抗体：CEA-TsAb，从而明确了三特异抗体识别肿瘤细胞的特异标记，一方面使三特异抗体能够区分肿瘤细胞和机体正常细胞，尽量避免非特异杀伤反应，另一方面，由于 CEA 是一种广谱肿瘤相关抗原，该三特异抗体在多种肿瘤的免疫治疗领域，具有了广阔的应用前景。

因此在本发明的一个方面，提供了一种用于治疗多种肿瘤的抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 基因工程单链三特异抗体。

在本发明的另一个方面，提供了一种构建该种三特异抗体的方法。

本发明所述的 CEA-TsAb 包含的抗 CEA 鼠源单链抗体的氨基酸序列

(SEQ ID NO : 1) 如下：
 QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGRTDYNER
 15 FKGKATFTGDVSSNTAYMKLSSLTSEDSAVYYCATGTTPFGYWGGTLTVSATSTPSHNSHQ
 VPSAGGPTANSRDIIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYTYMHWYQQKPGPPK
 LLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTAYYYCQHSWEIPRTFGGGTKLEIK

本发明所述的 CEA-TsAb 包含的抗 CD3 鼠源单链抗体的氨基酸序 (SEQ ID NO:2) 如下：
 20 EVKLVESGPPELVKPGASKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINPYKGVSTYNQK
 FKDKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSGYYGDSWYFDVWGAGTSVTVSSTSGG
 GGSGGGSGGGGSSRDIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLI
 YYTSRLHSGVPSKFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFAGGTKLELKRA

本发明所述的 CEA-TsAb 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:3) 如下：
 25 1 ATGGGTCTCGAGCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGTGCGGAAGTATGAA
 51 ACCGGGCGCGAGCGTGAAAATCAGCTGCAAAGCGACCGGCTATACCTTCA
 101 GCGATTATTGGATCGAATGGGTGAAACAGCGTCCGGGTCACGGCCTGGAA
 151 TGGATCGGTGAAATCCTGCCGGGCAGCGGCCGTACCGACTACAACGAACG
 201 TTTCAAAGGCAAAGCGACCTTACCGGCGACGTTTCTAGCAACACCGCGT
 30 251 ATATGAAACTGTCTAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCGGTGTATTACTGC

04-04-01

I040179

301 GCGACCGGCACCACCCCGTTCGGTACTGGGGTCAGGGCACCCTGGTTAC
351 CGTTTCCGCGACTAGTACCCCGAGCCATAACAGCCATCAGGTGCCGACCG
401 CGGGCGGCCCCGACCGCGAACAGCGGCTCTAGAGACATCGTGCTGACCCAG
451 AGCCCGGCGAGCCTGGCGGTGTCTCTGGGTCAGCGTGCGACCATCTCCTG
5 501 CCGTGCTTCCCAGTCCGTTTCCACCTCCTCCTACACCTACATGCACTGGT
551 ATCAGCAGAAACCGGGTCAGCCGCCGAAACTGCTGATCAAATATGCGAGC
601 AACCTGGAATCTGGTGTGCCGGCGCGTTTCAGCGGTTCTGGCAGCGGCAC
651 CGACTTCACCCTGAACATCCACCCGGTGGAAGAAGAAGATACCGCGTATT
701 ACTATTGCCAGCACTCTTGGGAAATCCCGCGTACCTTCGGTGGCGGCACC
10 751 AAACCTGGAAATCAAAGAATTCAACAGCACGTACCGGGTTGTAAGCGTCCT
801 CACCGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAATGCAAGA
851 GTACTGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA
901 GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTA
951 CACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATGG
15 1001 GACTTATTAATCCTTACAAAGGTGTTAGTACCTACAACCAGAAGTTCAAG
1051 GACAAGGCCACATTAACCTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGA
1101 ACTCCTCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAT
1151 CGGGGTACTACGGTGATAGTGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGA
1201 ACCTCAGTCACTGTCTCCTCAACTAGTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGG
20 1251 TGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTTCTAGAGACATCCAGATGACCCAGACCA
1301 CATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGG
1351 GCAAGTCAGGACATTAGAAATTATTTAAACTGGTATCAACAGAAACCAGA
1401 TGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAG
1451 TCCCATCAAAGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACC
25 1501 ATTAGCAACCTGGAGCAAGAGGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGG
1551 TAATACGCTTCCGTGGACGTTTCGCTGGAGGCACCAAACCTGGAACCTGAAGC
1601 GCGCTGTCGACTTCCAGAATGCGCTGCTGGTTCGTTACACCAAGAAAGTA
1651 CCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCCTGTAGAGGTCTCACATATGCAGGTACA
1701 GCTACAGGAATCTGGTCCGGGTCTGGTAAAACCGTCTCAGACCCTGTCTC
30 1751 TGACCTGTACCGTATCTGGTTTCTCTCTGTCTGACTATGGTGTTCATTGG

1040179

1801 GTACGTCAGCCGCCAGGTAAAGGTCTGGAATGTCTGGGTGTAATATGGGG
1851 TGGAGGCACGAATTATAATTCGGCTCTCATGTCCAGACGTGTAACCTCTT
1901 CCGACGATACCTCTAAAAATCAGTTCTCTCTGAAACTGTCTTCCGTAGAC
1951 ACCGCTGTATACTATTGTGCTCGTTCCTATTACTATTCTATGGACTACTG
5 2001 GGGTCAGGGCACCCTGGTAACCGTATCTTCCGGTACCGAACAAAACTCA
2051 TCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCACATCATCATCACCATCACGAG
2101 CAA

本发明所述的 CEA-TsAb 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 如下:
MGLEQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSQDWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGRTD
10 YNERFKGKATFTGDVSSNTAYMKLSSLTSEDSAVYYCATGTTTPFGYWGQGLVTVSATSTPSH
NSHQVPSAGGPTANSGSRDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYTYMHYQQKPG
QPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTAYYYCQHSWEIPRTFGGGTKL
EIKEFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKSTEVKLVESGPELVKPGASMKISCKASGYSFT
GYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINPYKGVSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAV
15 YYCARSGYYGDSDWYFDVWGAGTSVTVSSTSGGGGSGGGGSGGGGSSRDIQMTQTTSSLASL
GDRVITISCRASQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSKFSGSGSGTDYSLTISNL
EQEDIATYFCQQGNTLPWTFAGGTKLELKRAVDFQNALLVRYTKKVPQVSTPTPVEVSHMQVQ
LQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSDYGVHWVRQPPGKGLECLGVWGGGTNYNSALMSRR
VTSSDDTSKNQFSLKLSSVDTAVYYCARSYYYSMDYWGQGLVTVSSGTEQKLISEEDLNAA
20 HHHHHHEQ

在本发明的另一个方面, 提供了一种用于表达该抗体的载体:
CEA-TsAb/pTRI。

在本发明的另一个方面, 提供了一种含有上述载体的大肠杆菌宿主
细胞。

25 在本发明的另一个方面, 提供了一种低温诱导促进三特异抗体胞内
可溶表达的方法。

在本发明的另一个方面, 提供了一种采用 DEAE 阴离子交换树脂纯化
该三特异抗体的方法。

但是, 在本说明书的上下文, 尤其是“实施例”部分的公开内容的
30 基础上, 本发明的其它方面和优点对本领域的普通技术人员来说是显而易

见的。

附图说明：

5 图 1. 采用重叠 PCR 拼接用于构建 CEA-TsAb 的载体多克隆位点 DNA 的过程简图，其中符号 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 分别代表用于构建的合成寡聚核苷酸片段，字母 A、B、C、D、E，罗马数字 I、II、III、IV 和符号 UP、DOWN 分别代表构建过程中的中间产物，符号 WHOLE 代表终产物。

10 图 2. 重叠 PCR 拼接用于构建 CEA-TsAb 的载体多克隆位点 DNA 片段的琼脂糖电泳鉴定，第一泳道：重叠 PCR 拼接产物；第二泳道：DL2000 DNA 分子量标准（大连宝生物公司）

图 3. 多克隆位点 DNA 片段核苷酸序列、酶切位点及组成。

图 4. 构建 CEA-TsAb 的操作过程简图。

15 图 5. 用于构建 CEA-TsAb 的各中间载体和构建成功的含有 CEA-TsAb 的载体简图。

20 图 6. 构建 CEA-TsAb 过程中各中间产物和终产物的琼脂糖电泳鉴定，第 1 泳道：以质粒 pTRI 为模板的 PCR 产物；第 2 泳道：以质粒 CD28 VH/pTRI 为模板的 PCR 产物；第 3 泳道：以质粒 CD3 scFv/CD28 VH/pTRI 为模板的 PCR 产物；第 4 泳道：以质粒 CEA-TsAb/pTRI 为模板的 PCR 产物；第 5 泳道：DL2000 DNA 分子量标准（大连宝生物公司）

25 图 7. 采用重叠 PCR 拼接用于构建 CEA-TsAb 的载体多克隆位点 DNA 的过程简图，其中数字 1-22 分别代表用于构建的合成寡聚核苷酸片段，字母 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、a、b、c、d、e、f、g，罗马数字 I、II、III、IV 和符号 UP、DOWN 分别代表构建过程中的中间产物，符号 WHOLE 代表终产物。

图 8. 重叠 PCR 拼接用于构建抗 CEA 单链抗体 DNA 片段的琼脂糖电泳鉴定，泳道 1 和 9 为 DNA 分子量标准（大连宝生物公司）：DL2000；泳道 2-5 依次为构建过程的中间产物 I、II、III 和 IV；泳道 6 和 7 分别为构建过程的中间产物 UP 和 DOWN；泳道 8 为全长单链抗体片段 WHOLE。

30 图 9. 低温诱导 CEA-TsAb 胞内可溶表达的 SDS-PAGE 鉴定结果，泳道

1: 超声沉淀; 泳道 2: 超声上清; 泳道 3: 低分子量蛋白标准 (上海生物化学研究所); 泳道 4: pTRI 空载体表达超声沉淀; 泳道 5: pTRI 空载体表达超声上清, 其中箭头所指为 CEA-TsAb 特异条带。

图 10. 低温诱导表达 CEA-TsAb 的 Western blot 鉴定, 泳道 1: 预染蛋白分子量标准 (NEB 公司); 泳道 2: CEA-TsAb/pTRI 表达产物超声沉淀; 泳道 3: pTRI 空载体表达产物超声沉淀; 泳道 4: CEA-TsAb/pTRI 表达产物超声上清; 泳道 5: pTRI 空载体表达产物超声上清。

图 11. DEAE 阴离子交换纯化结果的 SDS-PAGE 鉴定, 泳道 1: pTRI 空载体表达产物超声上清; 泳道 2: CEA-TsAb 表达产物超声上清; 泳道 3: DEAE 阴离子交换纯化过柱流穿组分; 泳道 4: DEAE 阴离子交换纯化 NaCl 洗脱组分; 泳道 5: DEAE 阴离子交换纯化 NaOH 洗脱组分; 泳道 6: 低分子量蛋白标准 (购自上海生物化学研究所)。箭头所指为 CEA-TsAb 特异条带。

图 12. CEA-TsAb 的 ELISA 鉴定结果, 图中的曲线由上而下分别代表四种测定结果。第一条曲线: $10 \mu\text{g/ml}$ Jurkat 细胞膜抗原; 第二条曲线: $1 \mu\text{g/ml}$ CEA 抗原; 第三条曲线: $1 \mu\text{g/ml}$ CD28 抗原; 第四条曲线: 不被任何抗原的测定结果。

图 13. CEA-TsAb 对各种肿瘤细胞结合特异性的 FACS 鉴定结果, 图中带阴影的峰是不加抗体 CEA-TsAb 的对照样品测定结果, 不带阴影的峰是添加抗体 CEA-TsAb 的样品测定结果。

图 14. CEA-TsAb 对 Jurkat 细胞和 PBMC 细胞结合特异性的 FACS 鉴定, 图中带阴影的峰是不加抗体 CEA-TsAb 的对照样品测定结果, 不带阴影的峰是添加抗体 CEA-TsAb 的样品测定结果。

图 15. MTT 法检测不同效靶比对 CEA-TsAb 介导的 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞效率的影响, 三条曲线分别代表三个不同效靶比 ($E/T=10$ 、 5 、 1) 时, 杀伤肿瘤细胞的效率与抗体浓度的相关性, 图中的曲线由上而下分别代表三种不同的效靶比的特异杀伤率测定结果, 第一条曲线: 效靶比为 10 ; 第二条曲线: 效靶比为 5 ; 第三条曲线: 效靶比为 1 。

图 16. MTT 检测抗体浓度对 CEA-TsAb 介导的 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的效率的影响, 图中显示特异杀伤率的变化分为四个阶段: 阶段 1: 在

6 g/ml-12 g/ml 之间, 特异杀伤率与抗体浓度负相关, 在 12 g/ml 时, 特异杀伤率达到最高; 阶段 2: 特异杀伤率与抗体浓度正相关, 至 750ng/ml 时特异杀伤率最低; 阶段 3: 在 24ng/ml-750ng/ml 之间, 特异杀伤率与抗体浓度负相关, 在 24ng/ml 特异杀伤率最高; 阶段 4: 特异杀伤率与抗体浓度又出现正相关。

图 17. CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞过程中, 抗体浓度对 T 淋巴细胞增殖的影响。图中显示 SI 的变化分为三个阶段: 阶段 1: 抗体浓度在 1.5 g/ml-12 g/ml 之间, SI 与抗体浓度呈正相关变化, 在 1.5 g/ml 达到最低; 阶段 2: SI 与抗体浓度呈负相关变化, 在 47ng/ml 左右达到最高; 阶段 3: 在小于 47ng/ml 时, SI 与抗体浓度呈正相关变化, 在 0.7ng/ml 时 SI 最低。

图 18. CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞过程中细胞形态观察记录 (二), A: 单独培养 SW1116 细胞 20 小时后细胞形态; B-I: 按照效靶比为 5 共孵育 SW1116 细胞和 PBMC 细胞, 并添加 CEA-TsAb (终浓度为 1 g/ml) 共孵育 20 小时后处于不同杀伤阶段的各种细胞形态, 其中 B: 靶细胞由贴壁开始脱离; C: 效应细胞开始聚集在靶细胞的表面; D: 靶细胞表面局部出现突起; E: 靶细胞局部破碎; F: 靶细胞整体破碎; G-I: 靶细胞逐渐完全破碎。

图 19. CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的作用机制简图, 上图: CEA-TsAb 的结构简图; 下图: CEA-TsAb 杀伤肿瘤细胞的作用机制: CEA-TsAb 与肿瘤细胞和 CTL 细胞特异结合, 并通过活化 CTL 细胞而杀伤肿瘤细胞。

图 20. PI 和 FITC-Annexin V 双标记被杀伤的肿瘤细胞 (SW1116) 的荧光显微镜观察记录, A、B 和 C 行分别代表三种不同状态的被杀伤肿瘤细胞 (依次为坏死细胞、晚期凋亡细胞和早期凋亡细胞); 第 2 列为绿色荧光单色观察结果, 第 3 列为红色荧光单色观察结果, 第 1 列是采用 Leica QFISH 软件将前两种单色荧光观察结果进行叠加的结果。

图 21. PI 和 FITC-Annexin V 双标记被杀伤的肿瘤细胞 (SW1116) 的 FACS 检测结果, 代表不同细胞杀伤状态的明显各个分区: 左下区 (Low Left, LL) 为活细胞 (viable cells)、右下区 (Low Right, LR 为早期凋亡细胞

(early apoptosis cells)、左上区 (Up Left, UL) 为坏死细胞 (necrosis cells)、右上区 (Up Right, UR) 为晚期凋亡细胞 (late apoptosis cells)。不添加抗体组 (SW1116+PBMC): 左下区 90.17%, 右下区 1.66%, 左上区 5.94%, 右上区 2.23%; 添加 50ng/ml CEA-TsAb (SW1116+PBMC+CEA-TsAb):
5 左下区 52.83%, 右下区 16.12%, 左上区 9.80%, 右上区 21.25%。

发明详述

在本发明的上下文中, 所使用的术语除非另外说明, 一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地, 下列术语具有如下的含义:

10 本发明所构建的基因工程单链三特异抗体是采用基因工程重组的方法构建的, 同时具有三种抗原结合特异性的单一抗体分子。具体地, 本文所述的抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 单链三特异抗体是指将三种抗体片段通过两种连接肽 (FC 连接肽和 HSA 连接肽) (Min Fang, 2003) 串联在一起构建而成的单一分子的三特异抗体。可以在该抗体的 C 端添加 c-myc 标签和组氨酸标签 ((His)₆-tag) (Hengen, 1995; Fan et al., 1998), 用于活性检测和
15 纯化, 也可以不加。这三种抗体片段可以是单链抗体片段 (scFv: single chain fragment of variable region), 抗体 Fab 片段或单域抗体片段 (VH 或 VL)。更具体地, CEA-TsAb 是将抗 CEA scFv、抗 CD3scFv 和抗 CD28 VH 依次通过 FC 连接肽和 HSA 连接肽串联在一起, 再在 C 端添加 c-myc 标签
20 和组氨酸标签 ((His)₆-tag) 构建而成。该抗体具有以下优点:

1. 是基于 T 细胞活化需要双信号传递途径的理论基础之上构建的, 具有完全活化 T 细胞的能力。

2. 能够识别广谱肿瘤相关抗原: CEA, 能够介导 CTL 细胞特异杀伤多种肿瘤细胞, 具有治疗多种肿瘤的应用前景。

25 本文所述的低温诱导, 促进三特异抗体胞内可溶表达的方法是指采用 0.4mM 的 IPTG ((异丙基-β-D-半乳糖苷)) 在 30℃ 诱导大肠杆菌表达三特异抗体。这种方法能够保证大幅度减少包涵体形成, 胞内可溶表达的三特异抗体的比例 (占有三特异抗体的比例) 达到 50% 以上。使用该方法得到的表达产物不必进行的变性和复性, 直接进行纯化, 有利于提高产率
30 和节约成本。

本文所述的采用 DEAE 阴离子交换树脂，一步流穿纯化三特异抗体的方法是指在合适的 pH 值 (pH8.0)，将上述胞内可溶表达产物，经过一次 DEAE 阴离子交换层析，使几乎所有杂蛋白被吸附在 DEAE 柱上，而大部分三特异抗体随流穿液流出，三特异抗体的纯度达到 75%以上。

5 本发明的技术方案如下：

首先构建含有特定多克隆位点的中间载体：pTRI。然后从已有的表达载体上采用 PCR 的方法，扩增出抗 CD28 单域抗体的编码 DNA 片段：CD28 VH，同时将其两端的酶切位点更换为 *NdeI/KpnI*；再从已有的载体上扩增出抗 CD3 单链抗体的编码 DNA 片段，同时将其两端的酶切位点更换为
10 *ScaI/SaII*；再从已有的载体上切下 CEA scFv (*XhoI/EcoRI*)。最后按照一定的先后顺序进行酶切连接和转化反应即可以构建完成抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 单链三特异抗体：CEA-TsAb。

将 CEA-TsAb/pTRI 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后，进行 IPTG 低温诱导表达，表达产物超声上清经过一步 DEAE 阴离子交换后，即可以得到初步
15 纯化。采用酶联免疫吸附反应 (ELISA) 检测 CEA-TsAb 纯化产物的抗原结合活性；CEA-TsAb 纯化产物标记 FITC 后采用单色流式细胞术 (FACS) 检测的肿瘤细胞结合特异性；采用 MTT 方法检测 CEA-TsAb 纯化产物介导 T 淋巴细胞杀伤表达 CEA 的肿瘤细胞的效果；以及采用倒置显微镜记录上述杀伤过程中肿瘤细胞形态变化；采用 MTT 方法检测 CEA-TsAb 纯化产物介
20 导 T 淋巴细胞杀伤表达 CEA 的肿瘤细胞的过程中，T 细胞的增殖情况；采用 PI/annexin-V 双色 FACS 检测 CEA-TsAb 纯化产物介导 T 淋巴细胞杀伤表达 CEA 的肿瘤细胞，诱导其凋亡的效果，同时使用荧光显微镜记录上述杀伤过程中坏死或凋亡肿瘤细胞的形态。

25 具体实施方式

下面结合具体的实施例，并参照附图进一步详细地描述本发明。应理解，本说明书中的实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

30 实施例 1. 重叠 PCR 拼接用于构建三特异抗体表达载体 pTRI 的多克隆位

点 DNA 片段

重叠 PCR 拼接的流程图见图 1。用于拼接反应的寡聚核苷酸片段如下：

1. 5' -TAT ACC ATG GGT CTC GAG-3' (SEQ ID NO:5)
2. 5' -TAT ACC ATG GGT CTC GAG ATG TAC CCG CGC GGT AAC ACT AGT GAA
5 TTC AAC AGC ACG TA-3' (SEQ ID NO:6)
3. 5' -AGC CAG TCC TGG TGC AGT ACG GTG AGG ACG CTT ACA ACC CGG TAC
GTG CTG TTG AAT TC-3' (SEQ ID NO:7)
4. 5' -CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAA TAC AAA TGC AAG AGT
ACT TCT AGA ATG TA-3' (SEQ ID NO:8)
- 10 5. 5' -CGA ACC AGC AGC GCA TTC TGG AAG TCG ACG TTA CCG CGC GGG TAC
ATT CTA GAA GTA CT-3' (SEQ ID NO:9)
6. 5' -AAT GCG CTG CTG GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA
ACT CCA ACT CCT GT-3' (SEQ ID NO:10)
7. 5' -GCG GTA CCG TTA CCG CGC GGG TAC ATC ATA TGT GAG ACC TCT ACA
15 GGA GTT GGA GTT GA-3' (SEQ ID NO:11)
8. 5' -CGC GGT AAC GGT ACC GCG CTG GAA GTT GAC GAA ACC TAC GTT CCG
AAA GAA TTT AAC GC-3' (SEQ ID NO:12)
9. 5' -TCG CTA GCC CCA TCC GCG GGA TGT CAG CGT GGA AGG TGA AGG TTT
CCG CGT TAA ATT CTT TCG G-3' (SEQ ID NO:13)
- 20 10. 5' -ATC GAG CTC ATG TAC CCG CGC GGT AAC GCT AGC GAA CAA AAA
CTC ATC TCA GAA GAG GA-3' (SEQ ID NO:14)
11. 5' -TA TTG CTC GTG ATG GTG ATG ATG ATG TGC GGC CCC ATT CAG
ATC CTC TTC TGA GAT GAG-3' (SEQ ID NO:15)
12. 5' -CTC GAC GGA TCC TTA TTG CTC GTG ATG GTG-3' (SEQ ID NO:16)

25 操作步骤如下：

步骤 1：将片段 2-11 按照图 1 所示及如下的反应条件各自配对重叠延伸，不加引物。得到的反应产物不需要回收，可直接进行下一步反应。

反应条件：每个片段各 1 μ l；2 μ l 10 \times PCR 缓冲液；2 μ l dNTPs（每种 2mmol/ml）（大连宝生物技术公司）；0.3 μ l Taq（1U）（大连宝生物技术
30 公司）；水 14 μ l。

94℃预变性 1 分钟；94℃变性 30 秒；45℃退火 30 秒；72℃延伸 30 秒；进行 10 个循环。

得到反应产物 A（片段 2 和 3 配对）、B（片段 4 和 5 配对）、C（片段 6 和 7 配对）、D（片段 8 和 9 配对）和 E（片段 10 和 11 配对）。

- 5 步骤 2：将反应产物 A 和 B，B 和 C，C 和 D，D 和 E 按照图 1 所示及如下的反应条件各自配对重叠延伸，不加引物。1%琼脂糖凝胶电泳回收反应产物。反应产物 I（反应产物 A 和 B 配对）约 180 bp，II（反应产物 B 和 C 配对）约 180bp，III（反应产物 C 和 D 配对）约 180bp，IV（反应产物 D 和 E 配对）约 100bp。

- 10 反应条件：反应产物各 10 μ l，不需要补充其它反应成分，按照下述条件进行反应。

94℃预变性 1 分钟；94℃变性 30 秒；45℃退火 30 秒；72℃延伸 30 秒；进行 10 个循环。

- 15 步骤 3：将反应产物 I 和 II，III 和 IV 按照图 1 所示及如下的反应条件分别配对，重叠延伸。1%琼脂糖凝胶电泳回收反应产物。UP（反应产物 I 和 II 配对）约 340bp，DOWN（反应产物 III 和 IV）约 260bp）

反应条件：反应产物 I 和 II，III 和 IV 各 1 μ l；2 μ l 10 \times PCR 缓冲液；2 μ l dNTPs（每种 2mmol/ml）；0.3 μ l Taq（1U）；13 μ l 水。

94℃预变性 1 分钟；94℃变性 30 秒；72℃延伸 50 秒；进行 25 个循环。

- 20 步骤 4：反应产物 UP 和 DOWN 配对，重叠延伸，以片段 1 和 12 作为引物。反应条件：反应产物 UP 和 DOWN 各 1 μ l；引物各 1 μ l；2 μ l 10 \times PCR 缓冲液；2 μ l dNTPs（每种 2mmol/ml）；0.3 μ l Taq（1U）；水 12 μ l。94℃预变性 1 分钟；94℃变性 30 秒；72℃延伸 50 秒；进行 25 个循环。得到重叠 PCR 产物。

- 25 最后，重叠 PCR 产物经 1%琼脂糖电泳鉴定，片段大小为 439 bp，（见图 2），表明采用上述方法成功完成了多克隆位点 DNA 片段的拼接。重叠 PCR 产物即多克隆位点 DNA 片段的核苷酸序列、酶切位点及组成见图 3。

实施例 2：CEA-TsAb 的构建

- 30 具体构建过程参考图 4。在构建过程中使用的各种载体的简图见图 5。

构建过程具体操作步骤如下:

(1) 载体 pTRI 的构建:

将多克隆位点 DNA 片段和 pTMF 空载体 (Zhang et al., 2002) 同时进行 *NcoI*/*Bam*HI 双酶切反应, 回收多克隆位点 DNA 片段的酶切产物和 pTMF 酶切的大片段产物, 连接并转化 TOP10 菌株, 提取阳性转化克隆的质粒后经 PCR 鉴定得到正确的连接产物。将正确连接产物的质粒命名为 pTRI, 用于下一步操作。

其中所进行的酶切反应、连接反应、细菌感受态制备和转化反应的具体操作如下:

10 酶切反应: 使用 20 μ l 体系, 对约 1 μ g pTMF 空载体或多克隆位点 DNA 片段分别进行 *NcoI*/*Bam*HI (Promega 公司) 双酶切反应。酶的用量、缓冲溶液以及反应条件参见所用限制性内切酶的说明书。酶切产物经过 1% 琼脂糖电泳后, 采用胶回收试剂盒 (上海华舜公司) 回收特异大小的片段, pTMF 空载体酶切产物大小约 5000bp, 多克隆位点 DNA 片段酶切产物大小约为
15 430bp。

连接反应: 酶切后的 pTMF 载体片段: 50-100ng; 酶切后的多克隆位点 DNA 片段: 载体的 3-10 倍 (摩尔比); 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲溶液: 2 μ l; T4 DNA 连接酶 (大连宝生物公司) 1U; 补加 ddH₂O 至总体积为 20 μ l。16 $^{\circ}$ C 过夜连接。

20 制备大肠杆菌感受态细胞: 将 TOP10 菌株 (Invitrogen 公司) 转接在 2ml LB 培养基 ((10g/l tryptone (GIBCO 公司), 5g/l yeast extract (GIBCO 公司), 5g/l NaCl, pH7.5)) 中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按 1: 100 的比例转接至 20-40ml 无抗生素 LB 培养基中, 快速振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.3-0.4 时 (约 2.5 小时) 停止, 冰浴 15 分钟, 4 $^{\circ}$ C 4,000rpm 离心 10 分钟收集菌体, 弃上清, 25 加入 10ml 预冷的 0.1mol/ml CaCl₂ (Sigma 公司), 重悬混匀, 冰浴 20 分钟, 4 $^{\circ}$ C 4,000rpm 离心 10 分钟, 弃上清后加入预冷的含 12% 甘油的 0.1mol/ml CaCl₂ 1~2ml, 轻轻悬起菌体, 每管 200 μ l, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

连接产物的转化: 在 200 μ l 感受态细胞中加入 1 μ l 上述连接混合物, 混匀后冰浴 30 分钟, 42 $^{\circ}$ C 热激 100 秒, 然后迅速冰浴 2 分钟。向冰浴后的混合物中加入 0.8ml LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 轻摇 (<150rpm) 或静置 45 分钟
30

复苏; 10,000rpm 离心 1 分钟, 弃上清, 加 50~100 μ l LB 培养基重悬沉淀, 涂布于 LB-K 平板 (10g/l tryptone, 5g/l yeast extract, 5g/l NaCl, 15g/l 琼脂 (SIGMA 公司), 50 μ g/ml 卡那霉素 (SIGMA 公司), pH7.5), 37°C 培养过夜。

- 5 阳性重组克隆的筛选与鉴定: 挑取卡那霉素筛选阳性的连接产物单克隆, 接入 2ml LB-K 培养基 (10g/l tryptone, 5g/l yeast extract, 5g/l NaCl, 50 μ g/ml 卡那霉素 (SIGMA 公司), pH7.5), 37°C 振荡过夜培养, 然后按照质粒提取试剂盒 (上海华舜公司) 的说明书提取质粒 DNA, 命名为 pTRI。按照下述方法进行 PCR 鉴定。

- 10 PCR 鉴定: 在 20 μ l 的扩增体系中加入 0.1~1 μ l 质粒 DNA (约 20~200ng), 上游引物 (T7-up: 5' -TAATACGACTCACTATAGGGG A-3') (SEQ ID NO:17) 和下游引物 (T7-down: 5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') (SEQ ID NO:18) 各 10pmol, 2 μ l 10 \times Taq 酶缓冲液和 2 μ l 2mmol/ml 的 dNTPs, Taq 酶 1U, 补水至总体积 20 μ l。具体反应程序: 94°C 预变性 5 分钟后, 15 94°C 变性 40 秒, 53°C 退火 40 秒, 72°C 延伸 40 秒, 扩增 25 个循环, 取 5 μ l PCR 产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果见图 6, PCR 产物大小约为 500bp。

(2) CD28 VH/pTRI 的构建

- 采用 PCR 方法从质粒 CD28 VH/pTMF (Cheng et al., 2002) 上扩增抗 CD28 VH 的 DNA 片段, 由于所使用的上游引物 (P1: 5' -TCACATATGCA GGTAC AGC TACAG-3') (SEQ ID NO:19) 和下游引物 (P2: 5' -TTCGCTAGCGGAAGATACGGTA CCA-3') (SEQ ID NO:20) 的 5' 端分别带有酶切位点: *Nde*I 和 *Nhe*I, 因此 PCR 产物的两端也会带上这两个新的酶切位点。

- 25 PCR 反应混合物组成: 引物各 1 μ l, dNTPs 2 μ l (每种 2mmol/ml), 10 \times pfu 缓冲液 2 μ l, 质粒 CD28 VH/pTMF 1 μ l (约 100 ng), Pfu 酶 (Promega 公司) 0.3 μ l, 补 ddH₂O 至 20 μ l。PCR 反应条件: 94°C 预变性 3 分钟, 94°C 变性 30 秒, 55°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 50 秒, 一共反应 25 个循环。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒 (上海华舜公司) 回收约 350bp 的 PCR 产物。

- 30 将该 PCR 产物与载体 pTRI 进行 *Nde*I/*Nhe*I (Promega 公司) 双酶切反

应，具体酶切反应条件参照酶供应商的说明书，用胶回收试剂盒回收 PCR 产物的酶切产物（约 350bp）和 pTRI 酶切大片段产物（约 5300bp），经连接和转化，具体反应过程参照上述步骤(1)，然后提取卡那霉素抗性阳性克隆进行 PCR 鉴定，鉴定方法参考上述步骤(1)。结果见图 6，PCR 产物大小
5 大小为 750bp 左右的克隆为正确连接的质粒，命名为 CD28 VH/pTRI，用于下一步操作。

(3) CD3 scFv/ CD28 VH/pTRI 的构建

采用 PCR 方法从质粒 CD3 scFv/pTMF（刘喜富 等，1996）上扩增抗 CD3 scFv 的 DNA 片段，由于所使用的上游引物（P1：
10 5' -AAGAGTACTGAGGTGAAGCTGGTGG-3'）（SEQ ID NO:21）和下游引物（P2：
5' -GAAGTCGACAGCGCGCTTCAGTTCCAG-3'）（SEQ ID NO:22）的 5' 端分别带有酶切位点：ScaI 和 SalI，因此 PCR 产物的两端也会带上这两个新的酶切位点。

PCR 反应混合物组成：引物各 1 μ l，dNTPs 2 μ l（每种 2mmol/ml），
15 10 \times pfu 缓冲液 2 μ l，质粒 CD3 scFv/pTMF 1 μ l（约 100 ng），Pfu 酶（Promega 公司）0.3 μ l，补 ddH₂O 至 20 μ l。PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟，94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，55 $^{\circ}$ C 复性 30 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 50 秒，一共反应 25 个循环。采用 1%琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒（上海华舜公司）回收 750bp 左右的 PCR 产物。

20 将该 PCR 产物与载体 CD28 VH/pTRI 同时 ScaI/SalI（Promega 公司）双酶切反应，具体酶切反应条件参照酶供应商的说明书，用胶回收试剂盒回收 PCR 产物的酶切产物（750bp 左右）和 CD28 VH/pTRI 酶切大片段产物（5700bp 左右），进一步进行连接和转化 TOP10 菌株。具体连接和转化反应过程参照上述步骤(1)，然后提取卡那霉素抗性阳性克隆进行 PCR 鉴定。
25 PCR 鉴定方法参考上述步骤(1)。鉴定结果见图 6，PCR 产物大小为 1400bp 左右的克隆为正确连接的质粒，保留鉴定阳性的克隆，提取质粒命名为 CD3 scFv/ CD28 VH/pTRI，用于下一步操作。

(4) CEA-TsAb/pTRI 的构建

重叠 PCR 构建抗 CEA 单链抗体：

30 将抗 CEA 单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列(Koga et

al., 1990) 以一段多肽序列 (GGGSGGGSGGGGS) (SEQ ID NO: 23) 连接起来, 设计成抗 CEA 单链抗体。然后按照大肠杆菌喜好的密码子表 (Nakamura et al., 2000) 将其反向翻译成一段 DNA 序列, 并进一步拆分成互补的寡聚核苷酸片段 (下述序列 1-22), 以便于使用重叠 PCR 技术拼接成全长的抗 CEA 单链抗体 DNA 片段。以下为用于拼接抗 CEA 单链抗体全基因片段的寡聚核苷酸片段。

1. 5' -TTCCTCGAGCAGGTTTCAGCT-3' (SEQ ID NO: 24)
2. 5' -TCGCGCCCGGTTTCATCAGTTCCGCACCGCTCTGCTGCAGCTGAACCTGCTCGA
GGAA-3' (SEQ ID NO: 25)
- 10 3. 5' -ACTGATGAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAATCAGCTGCAAAGCGACCGGCTATAC
CTTC-3' (SEQ ID NO: 26)
4. 5' -CACCCATTCGATCCAATAATCGCTGAAGGTATAGCCGGTCGCTT-3' (SEQ
ID NO: 27)
5. 5' -ATTATTGGATCGAATGGGTGAAACAGCGTCCGGGTCACGGCCTGGAATGGATCG
GTGAA-3' (SEQ ID NO: 28)
- 15 6. 5' -ACGTTTCGTTGTAGTCGGTACGGCCGCTGCCCCGGCAGGATTCACCGATCCATTC
CAGG-3' (SEQ ID NO: 29)
7. 5' -CGTACCGACTACAACGAACGTTTCAAAGGCAAAGCGACCTTCACCGGCGACGTT
TCTAGC-3' (SEQ ID NO: 30)
- 20 8. 5' -TTCGCTGGTCAGGCTAGACAGTTTTCATATACGCGGTGTTGCTAGAAACGTCGCC
GGTGAA-3' (SEQ ID NO: 31)
9. 5' -TGTCTAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCGGTGTATTACTGCGCGACCGGCACCA
CCCCG-3' (SEQ ID NO: 32)
10. 5' -GCTCACGGTCACCAGGGTGCCCTGACCCCAGTAACCGAACGGGGTGGTGCCGGT
CGCGCA-3' (SEQ ID NO: 33)
- 25 11. 5' -GCACCCTGGTGACCGTGAGCGCGACTAGTACCCCGAGCCATAACAGCCATCAGG
TGCCG-3' (SEQ ID NO: 34)
12. 5' -GTCTCTAGAGCCGCTGTTTCGCGGTGCGGCCGCCCCGCGCTCGGCACCTGATGGCT
GTTAT-3' (SEQ ID NO: 35)
- 30 13. 5' -CGAACAGCGGCTCTAGAGACATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGAGCCTGGCGG

1040179

- TGTC-3' (SEQ ID NO:36)
14. 5' -CTGGGAAGCACGGCAGGAGATGGTCGCACGCTGACCCAGAGACACCGCCAGGCT
CGCCGG-3' (SEQ ID NO:37)
15. 5' -TCTCCTGCCGTGCTTCCCAGTCCGTTTCCACCTCCTCCTACACCTACATGCACT
GGTAT-3' (SEQ ID NO:38)
16. 5' -GATCAGCAGTTTCGGCGGCTGACCCGGTTTCTGCTGATACCAGTGCATGTAGGT
GT-3' (SEQ ID NO:39)
17. 5' -AGCCGCCGAAACTGCTGATCAAATATGCGAGCAACCTGGAATCTGGTGTGCCGG
CGCGT-3' (SEQ ID NO:40)
18. 5' -G TTCAGGGTGAAGTCGGTGCCGCTGCCAGAACCGCTGAAACGCGCCGGCACACC
AGATT-3' (SEQ ID NO:41)
19. 5' -GCACCGACTTCACCCTGAACATCCACCCGGTGAAGAAGAAGATACCGCGTATT
ACTAT-3' (SEQ ID NO:42)
20. 5' -GCCACCGAAGGTACGCGGGATTTCCCAAGAGTGCTGGCAATAGTAATACGCGGT
ATCTT-3' (SEQ ID NO:43)
21. 5' -TCCCGCGTACCTTCGGTGGCGGCACCAAACCTGGAAATCAAAGAATTTCGCC-3'
(SEQ ID NO:44)
22. 5' -GGCGAATTCTTTGATTTCAG-3' (SEQ ID NO:45)
- S1) 5' -GGCGAATTCTTTGATTTCAG-3' (SEQ ID NO:46)
- 20 S17) 5' -AGCCGCCGAAACTGCTGATC-3' (SEQ ID NO:47)
- S16) 5' -GATCAGCAGTTTCGGCGGCT-3' (SEQ ID NO:48)
- S13) 5' -CGAACAGCGGCTCTAGAGAC-3' (SEQ ID NO:49)
- S12) 5' -GTCTCTAGAGCCGCTGTTCG-3' (SEQ ID NO:50)
- S7) 5' -GTACCGACTACAACGAACGT-3' (SEQ ID NO:51)
- 25 S6) 5' -ACGTTCGTTGTAGTCGGTAC-3' (SEQ ID NO:52)

步骤 1: 将片段 1-22 各自配对重叠延伸, 不加引物, 反应产物不需要回收, 直接进行下一步反应。用于反应的每个片段各 $1\mu\text{l}$ (10 pmol); $2\mu\text{l}$ $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 (500mM KCl, 50mM Tris pH 8.5, 25 mM $\text{Mg}(\text{Cl})_2$ 下同); $2\mu\text{l}$ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 每种 2mM) (购自大连宝生物技术公司, 下同); $0.3\mu\text{l}$ Taq (1U) (购自大连宝生物技术公司, 下同);

水 14 μ l。反应条件: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 30sec; 45°C 退火 30sec; 72°C 延伸 30sec; 10 个循环。

得到反应产物 A (片段 1 和 2 配对)、B (片段 3 和 4 配对)、C (片段 5 和 6 配对)、D (片段 7 和 8 配对)、E (片段 9 和 10 配对)、F (片段 11 和 12 配对)、G (片段 13 和 14 配对)、H (片段 15 和 16 配对)、I (片段 17 和 18 配对)、J (片段 19 和 20 配对)、K (片段 21 和 22 配对)。

步骤 2: 将反应产物 A 和 B, D 和 E, G 和 H, J 和 K 各自配对重叠延伸, 不加引物。用于反应的每种物质各 10 μ l (10 pmol)。反应条件: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 30 sec; 45°C 退火 30 sec; 72°C 延伸 30 sec; 10 个循环。经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用胶回收试剂盒进行回收反应产物: a (A 和 B 配对)、b (C)、c (D 和 E 配对)、d (F)、e (G 和 H 配对), f (I) 和 g (J 和 K 配对)。a 和 g 的大小为 120bp, c 和 e 的大小约为 170 bp, b、d 和 f 的大小约为 100bp。

步骤 3: 将 a 与 b、c 与 d、f 与 g 分别配对, 单独使用反应产物 e, 添加各自引物 (s1 和 s6 对应 a 和 b 的配对, s7 和 s12 对应 c 和 d 的配对, s13 和 s16 对应 e, s17 和 22 对应 f 和 g 的配对), 进行 PCR 扩增。用于反应的每种物质各 1 μ l (约 100ng); 2 μ l 10 \times PCR 缓冲液; 2 μ l dNTPs (每种 2mM); 引物各 1 μ l (10 pmol); 0.3 μ l Taq (1U); 补加水至终体积为 20 μ l。反应条件: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 30sec; 45°C 退火 30sec; 72°C 延伸 30sec; 25 个循环。经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用胶回收试剂盒进行回收反应产物 I (a 和 b 配对)、II (c 和 d 配对)、III (对应于反应产物 e) 和 IV (f 和 g 配对)。反应产物 I 大小约为 200 bp, II 大小约为 250bp, III 的大小约为 140bp, IV 的大小约为 230bp。

步骤 4: 将反应产物 I 与 II、III 与 IV 分别配对, 添加各自引物 (s1 和 s12 对应 I 和 II 的配对, s13 和 22 对应 III 和 IV 的配对), 进行 PCR 扩增。用于反应的每种物质各 1 μ l (约 100 ng); 2 μ l 10 \times PCR 缓冲液; 2 μ l dNTP (2mM each); 引物各 1 μ l (10 pmol); 0.3 μ l Taq (1U); 水 12 μ l。反应条件: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 30sec; 45°C 退火 30sec; 72°C 延伸 30sec; 25 个循环。得到反应产物 UP (I 和 II 配对) 和 DOWN (III 和 IV 配对), 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用胶回收试剂盒进行回收。UP 的

大小约为 430bp, DOWN 的大小约为 340bp。

步骤 5: 将反应产物 UP 和 DOWN 配对, 添加引物 (片段 s1 和片段 22) 进行 PCR 扩增。反应产物 UP 和 DOWN 各 1 μ l (约 100 ng); 2 μ l 10 \times PCR 缓冲液; 2 μ l dNTP (每种 2mM); 引物各 1 μ l (10 pmol); 0.3 μ l Taq (1U); 水 12 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec; 45 $^{\circ}$ C 退火 30sec; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 25 个循环。得到的反应产物 WHOLE (约 750bp) 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用胶回收试剂盒进行回收。

上述操作步骤流程参见图 7, 各个步骤的反应产物的 PCR 鉴定见图 8。

将上述 750bp 的 DNA 片段和载体 pTMF 同时进行 *Xho*I 和 *Eco*RI (Promega) 双酶切反应。具体酶切反应条件参照酶供应商的说明书。采用胶回收试剂盒回收 PCR 产物的酶切产物 (750bp 左右) 和 pTMF 酶切大片段产物 (5200bp 左右), 进行连接和转化 TOP10 菌株, 具体连接和转化反应过程参照的步骤 (1)。然后提取卡那霉素抗性阳性克隆, 命名为 CEA scFv/pTMF。

将 CEA scFv/pTMF 与 CD3 scFv/CD28 VH/pTRI 同时进行 *Xho*I 和 *Eco*RI (Promega) 双酶切反应。具体酶切反应条件参照酶供应商的说明书。将 750bp 左右的 CEA scFv/pTMF 酶切小片段产物 (抗 CEA scFv) 和 CD3 scFv/CD28 VH/pTRI 的酶切大片段 (6000bp 左右) 产物进行连接和转化 TOP10 菌株, 具体连接和转化反应过程参照的步骤 (1)。然后提取卡那霉素抗性阳性克隆进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定方法参考步骤 (1)。鉴定结果见图 6, PCR 产物大小为 2100bp 左右的克隆为正确连接的质粒, 命名为 CEA-TsAb/pTRI。

实施例 3: CEA-TsAb 的低温诱导胞内可溶表达

(1) 将 CEA-TsAb/pTRI 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) (Novagen 公司)

按照实施例 2 中所述制备感受态细胞的方法, 制备大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。按照质粒提取试剂盒 (上海华舜公司) 的说明书提取质粒 CEA-TsAb/pTRI, 按照实施例 2 步骤 (1) 进行转化实验, 并如实施例 2 所述进行鉴定。

(2) 低温诱导表达

将含有 CEA-TsAb/pTRI 的 BL21(DE3) 涂 LB-K 平板, 37℃ 过夜培养, 然后挑取单克隆, 接种于 5ml LB-K 液体培养基中, 在大试管内, 37℃ 摇床培养过夜 (200 转/分钟)。次日取过夜培养物按 1/100 的比例转接到 250ml LB-K 液体培养基中, 继续 37℃ 摇床培养 (200 转/分钟) 至 $A_{600}=0.6$, 补加 IPTG (大连宝生物公司) 至终浓度为 0.4mmol/ml, 继续在 30℃ 培养 4 小时, 进行低温诱导表达。室温 12,000rpm 离心 10 分钟, 收集菌体, 悬于 1/5 培养体积的 PBS 缓冲液中, 进行菌体超声破碎。经过进一步室温 12,000m 离心 10 分钟后, 离心上清组分含有胞内可溶表达的 CEA-TsAb; 离心沉淀含有以包涵体形式表达的 CEA-TsAb, 将离心沉淀悬浮在 1/5 培养体积的 PBS 中。按照《分子克隆实验指南》(金冬雁, 黎孟枫译, 1996, 科学出版社), 采用还原 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测上述超声上清和超声沉淀中 CEA-TsAb 的表达情况, 并使用数字图象分析仪 (美国 Alpha Innotech 公司, AlphaImage 2200 Documentation & analysis system) 确定胞内可溶表达和包涵体表达的相对比例。SDS-PAGE 电泳 (见图 9) 和 Western blot (见图 10) 的结果表明, 采用上述胞内可溶表达的方法, 胞内可溶表达的比例达到 70% 左右。因为超声上清可以直接用于纯化和后续的体外活性实验, 省去了变性和复性的步骤, 大大节约生产成本和时间。

20 实施例 4: 采用 DEAE 阴离子交换树脂纯化 CEA-TsAb

将上述 250ml 的低温诱导胞内可溶表达产物室温 12,000rpm 离心 10 分钟, 收集菌体并悬于 1/5 体积 (50ml) 的 DEAE 阴离子交换树脂 (发玛西亚公司) 的平衡缓冲液 (20mmol/ml NaCl, 50mmol/ml Tris-HCl, pH8.0) 中, 进行超声破碎。然后室温 12,000rpm 离心 10 分钟, 离心上清直接用于纯化。

将 20ml DEAE 阴离子交换树脂悬浮在 100ml 平衡缓冲液中, 进行装柱 (上海华美公司), 柱的规格为: 16mm×20cm; 然后使用 5 个柱体积的平衡缓冲液进行平衡, 流速为 1ml/分钟; 将上述超声产物的离心上清直接上柱, 上样流速为 0.25ml/分钟, 收集流穿组分, 即为纯化的 CEA-TsAb; 收集结束后, 使用 2 个柱体积 (约 40ml) 的洗脱缓冲液 (500mmol/ml NaCl,

50mmol/ml Tris-HCl, pH8.0) 进行洗脱, 流速为 0.25ml/分钟; 使用 2 个柱体积 (约 40ml) 0.5mol/L NaOH 清洗柱料, 2 个柱体积 (40ml) 1mol/L NaCl 进行柱的再生, 流速为 0.5ml/分钟; 最后再使用 2 个柱体积 (40ml) 平衡缓冲液平衡柱料, 流速为 1ml/分钟用于下一次纯化。如果较长时间不使用, 必须使用 4 个柱体积以上的 20%乙醇水溶液过柱后, 保存在 4℃, 以免柱料滋生细菌。

上述流穿组分, 直接进行还原 SDS-PAGE, 鉴定纯化效果。SDS-PAGE 的结果 (见图 11) 显示: 经过一步 DEAE 阴离子交换纯化, 可以去除超声上清中的大部分杂蛋白, 使用数字图象分析仪 (美国 Alpha Innotech 公司, AlphaImage 2200 Documentation & analysis system) 确定 CEA-TsAb 的纯度达到 70%左右。

上述纯化样品需要对 PBS (8 克 NaCl, 0.2 克 KCl, 1.44 克 Na_2HPO_4 和 0.24 克 KH_2PO_4 , 用 HCl 调 pH 至 7.4, 定容至 1 升) 透析过夜 (4℃)。透析体积为 500ml, 每隔 6 个小时换一次透析液。采用 Bradford 法对透析后的样品进行蛋白定量, 具体操作按照《精编分子生物学实验指南》(颜子颖, 王海林译, 金冬雁校, 1999, 科学出版社,) 进行。定量后的样品补加 NaN_3 (Sigma 公司) 至终浓度 0.05%(W/V), 作为防腐剂; 补加海藻糖 (购自中国科学院微生物研究所) 至终浓度 0.15mol/L, 作为稳定剂。然后分装为 1ml/份冻存于 -80℃, 待用。

20

实施例 5: ELISA 方法检测 CEA-TsAb 的抗原结合活性

Jurkat 细胞膜抗原的制备: 收集 Jurkat 细胞 (人急性白血病淋巴瘤细胞) (购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 序号: TIB-152) 约 5×10^6 , 1,000g 离心 10 分钟后, 将细胞沉淀悬浮在 0.5ml PBS 中, 进行超声破碎。将超声破碎液 12,000rpm 室温离心 10 分钟后, 保留超声上清, 使用 Bradford 法进行蛋白浓度定量。然后补加 NaN_3 至终浓度 0.05%(W/V), 作为防腐剂; 补加海藻糖 (购自中国科学院微生物研究所) 至终浓度 0.15mol/L, 作为稳定剂。然后分装为 100 μ l /份冻存于 -80℃, 待用。

30 ELISA 操作步骤:

- (1) 包被: 抗原浓度分别为 $1 \mu\text{g/ml}$ CEA (Fitzerald 公司, 德国); $1 \mu\text{g/ml}$ CD28-FC chimera (R&D 公司); $10 \mu\text{g/ml}$ Jurkat 细胞膜抗原。包被体积为 $100 \mu\text{l}$ /孔包被。包被缓冲液配方: $1.36\text{g Na}_2\text{CO}_3$, 7.35g NaHCO_3 , 950ml 水, 使用 1mol/L HCl 或 1mol/L 的 NaOH 调 $\text{pH}9.2$, 补水至 1L 。PBS 37°C 包被 2 小时或 4°C 包被过夜。
- (2) 封闭: PBS 洗板 1-2 次后, 加入封闭液 PBSA (PBS-1%BSA (W/V)), $200 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 封闭 1-2 小时。
- (3) 加样: PBS 洗板三次后, 加入纯化样品, $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 1-2 小时。样品使用方法: 以 $10 \mu\text{g/ml}$ 的纯化 CEA-TsAb 作为起始浓度, 进行倍比稀释 6 个梯度, 每个梯度三复孔。
- (4) 加入第一抗体: PBST (PBS-0.05%Twen-20 (V/V)) 洗板三次后, 以封闭液 1/1000 稀释抗 cmyc-tag 单抗 (9E10, 购自 SANTA CRUTZ 公司), $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 1-2 小时。
- (5) 加入第二抗体: PBST 洗板三次后, 以封闭液 1/1000 稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (购自华美公司), $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 1-2 小时。
- (6) 显色: PBST 洗板 5 次后, 添加显色液 ($48.6\text{ml } 0.1\text{M}$ 柠檬酸, $51.4\text{ml } 0.2\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ 加水至 1L , $\text{pH}5.0$, 配成底物缓冲液; 10ml 底物缓冲液中加入 4mg OPD 即邻苯二胺 (Sigma 公司), $15 \mu\text{l } 30\%\text{H}_2\text{O}_2$ 配成显色液), $100 \mu\text{l}$ /孔, 室温避光显色 15-30 分钟。
- (7) 终止反应: 添加终止液 (1mol/L HCl), $50 \mu\text{l}$ /孔。
- (8) 测定结果: 在 490nm 读取吸光值。

ELISA 结果 (见图 12) 显示, CEA-TsAb 与两种纯抗原 (CEA 和 CD28) 特异结合。由于 Jurkat 丰富表达 CD3, 因此 CEA-TsAb 与 CD3 也特异结合。

25 实施例 6: FACS (流式细胞术) 方法检测 CEA-TsAb 与肿瘤细胞的结合活性

首先采用间接 FACS 方法检测 CEA-TsAb 对各种肿瘤细胞的结合特异性。所使用的各种肿瘤细胞的肿瘤相关性和组织来源见下表。

名称	肿瘤相关性	来源
A549	肺腺癌	ATCC CCL-185
MCF-7	乳腺癌	ATCC HTB-22
SKOV3	卵巢癌	ATCC HTB 77
SW1116	结肠癌	ATCC CCL-233

具体操作如下:

(1) 培养、收集上述 4 种细胞: 除 SW1116 细胞外, 其余 3 种细胞的培养条件均为: RPMI-1640 液体培养基 (GIBCO 公司), 10% 胎牛血清 (黑龙江江海生物工程技术公司), 5% CO₂, 37℃ 孵箱培养; SW1116 细胞的培养条件: L15 液体培养基 (GIBCO 公司), 10% 新生牛血清 (黑龙江江海生物工程技术公司), 5% CO₂, 37℃ 孵箱培养。在细胞生长至对数期后, 每种细胞收集 5×10^5 个。

(2) 将上述各种细胞 1,000g 离心 10 分钟后, 使用 PBS 悬浮细胞, 再次 1,000g 离心 10 分钟后, 将细胞沉淀悬浮在 100 μ l 含有 10 μ g/ml CEA-TsAb 的 PBS 中, 4℃ 放置 30 分钟。每种细胞均设立不加抗体的同型对照, 该对照以下各步均与待测样品同样操作。

(3) 1,000g 离心 10 分钟后, 将细胞沉淀悬浮在 100 μ l 含有 1/1000 稀释抗 cmyc-tag 抗体 (9E10, SANTA CRUTZ 公司) 的 PBS 中, 继续 4℃ 放置 30 分钟。

(4) 1,000g 离心 10 分钟后, 将细胞沉淀悬浮在 100 μ l 含有 1/1000 稀释 FITC 偶联羊抗鼠 IgG (BD 公司) 的 PBS 中, 继续 4℃ 放置 30 分钟。

(5) 流式细胞仪 (BD 公司, FACS Calibur) 检测, 激发光为 488nm, 每次收 10,000 个细胞。

上述实验结果 (见图 13) 显示, CEA-TsAb 与各种肿瘤细胞的结合能力不同: 与 SKOV3、SW1116 有较强结合; 与 A549 发生较弱结合; 与 MCF-7

不发生结合。

实施例7: FACS(流式细胞术)方法检测 CEA-TsAb 与外周血淋巴细胞(PBMC)和 Jurkat 细胞的结合活性

5 我们还采用直接 FACS 的方法检测 CEA-TsAb 对外周血淋巴细胞(PBMC) (购自北京市输血中心) 和 Jurkat 细胞的结合活性。具体实验操作如下: (1) 将 CEA-TsAb 标记荧光素 FITC (Sigma 公司)。荧光标记方法按照《现代免疫学实验技术》(沈关心 周汝麟 主编, 湖北科学技术出版社出版) 所述操作。

10 (2) 采用 Ficoll 方法提取 PBMC (外周血淋巴细胞), 并在含有 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在玻璃细胞培养瓶中, 37℃ 放置过夜, 吸附并去除巨噬细胞等粘附细胞。将未吸附的细胞 (主要是 T 淋巴细胞) 计数后, 收集 5×10^5 个细胞, 用于 FACS 检测。Ficoll 方法方法《现代免疫学实验技术》(沈关心 周汝麟 主编, 湖北科学技术出版社出版) 所述操作。

15 (3) 采用含有 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基, 在 37℃ CO₂ (5%) 培养箱中培养两种细胞。待细胞生长至对数期后, 收集 5×10^5 个细胞, 用于 FACS 检测。

(4) 将上述两种细胞 1,000g 离心 10 分钟后, 使用 PBS 悬浮细胞, 再次 1,000g 离心 10 分钟后, 将细胞沉淀悬浮在 100 μ l 含有 10 μ g/ml FITC 20 标记 CEA-TsAb 的 PBS 中, 4℃ 放置 30 分钟。每种细胞均设立不加抗体的同型对照, 该对照以下各步均与待测样品同样操作。

(5) 流式细胞仪 (BD 公司, FACS Calibur) 检测, 激发光为 488nm, 每次收 10,000 个细胞。

25 上述实验结果 (见图 14) 显示: CEA-TsAb 与两种细胞均能发生特异结合。

综合 CEA-TsAb 与肿瘤细胞的结合特异性实验, CEA-TsAb 与 PBMC 及 Jurkat 细胞的结合特异性实验, 可以得出结论: CEA-TsAb 与 T 淋巴细胞和表达 CEA 的肿瘤细胞均能发生特异结合作用。

30 实施例 8: MTT 方法检测 CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤结肠癌细胞 SW1116

的活性

我们以与 CEA-TsAb 发生特异结合的结肠癌细胞 SW1116 为靶细胞 (Target cells), 以 PBMC 为效应细胞 (Effect cells), 在体外按照一定的效靶比 (靶细胞/效应细胞, E/T) 混合, 同时添加一定浓度的 CEA-TsAb, 然后在 37°C 培养 48 小时, 再采用 MTT 方法测定肿瘤细胞的存活情况。以此检测 CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤结肠癌细胞 SW1116 的活性。具体操作如下:

- (1) 提取收集 PBMC, 具体操作与实施例 7 相同。
- (2) 培养收集 SW1116 细胞, 具体操作与实施例 6 相同。
- (3) 使用 L15 培养基 (购自 GIBCO 公司) 调整效应细胞 (PBMC) 和靶细胞 (SW1116) 的浓度: 固定 SW1116 细胞的密度为 1×10^5 个/ml, 100 1/孔加入到 96 孔细胞培养板 (Nunc 公司) 中。同时添加不同浓度的 PBMC, 100 1/孔加入到上述细胞培养板中, 以分别对应不同的效靶比 (分别为 1、5、10)。同时使用 L15 培养基调整 CEA-TsAb 的浓度 5 倍浓缩于使用抗体浓度 (例如 CEA-TsAb 使用浓度为 1 g/ml, 那么浓缩液的浓度应为 5 g/ml)。
- 将抗体浓缩液以 50 1/孔加入已经加有效应细胞和靶细胞的 96 孔细胞培养板中, 然后在 37°C 的 CO₂ (5%) 培养箱中, 培养 48 小时。每种样品均为 4 复孔。同时每种效靶比均设立不加抗体的阴性对照, 单独效应细胞或靶细胞的阴性对照以及不加任何细胞的培养基阴性对照。
- (4) 将细胞培养基弃掉后, 使用 PBS (300 1/孔) 洗板一次, 再加入 MTT (Sigma 公司) 溶液 (浓度: 200 1/孔), 37°C 孵育 4 小时后, 使用 PBS (300 1/孔) 洗板一次, 加入 DMSO (二甲基亚砷, 200 1/孔) (Sigma 公司) 37°C 孵育 30 分钟后, 测定 A₆₀₀。

(5) 特异杀伤率 (specific cytotoxicity) 的计算公式为:

$$\text{特异杀伤率 (\%)} = [A_{600}(E/T) - A_{600}(E/T/A)] / [A_{600}(E/T) - A_{600}(M)] \times 100\%$$

A₆₀₀(E/T): 每种效靶比不加抗体的阴性对照孔的 A₆₀₀ 测定值;

A₆₀₀(E/T/A): 每种样品的 A₆₀₀ 测定值;

A₆₀₀(M): 不加任何细胞的培养基阴性对照的 A₆₀₀ 测定值。

采用上述方法我们首先比较了不同效靶比 (1、5、10) 对 CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的效率的影响, 结果 (图 15) 显示, 杀伤

效率并未随着效靶比的提高而提高。效靶比为 1 时, 特异杀伤效率最低; 效靶比为 10 时居次; 效靶比为 5 时特异杀伤率最高。最高特异杀伤率达到 85% 左右。这说明特异杀伤率不仅与效靶比有关, 可能还受其他因素的影响。为了进一步研究抗体浓度对特异杀伤率的影响, 我们固定效靶比为 5, 测定特异杀伤率的抗体浓度 (0.4 ng/ml-12 g/ml) 依赖曲线。结果 (见图 16) 发现特异杀伤率的变化分为四个阶段: 阶段 1: 在 6 g/ml-12 g/ml 之间, 特异杀伤率与抗体浓度负相关, 在 12 g/ml 时, 特异杀伤率达到最高; 阶段 2: 特异杀伤率与抗体浓度正相关, 至 750 ng/ml 时特异杀伤率最低; 阶段 3: 在 24 ng/ml-750 ng/ml 之间, 特异杀伤率与抗体浓度负相关, 在 24 ng/ml 特异杀伤率最高; 阶段 4: 特异杀伤率与抗体浓度又出现正相关。从整个过程看, 特异杀伤率出现两个最大值: 12 g/ml 时约为 85%; 24 ng/ml 时约为 70%。该结果表明, 在较低的效靶比和极低的抗体浓度下, CEA-TsAb 仍然保持高效介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力。

15 实施例 9: CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤 SW1116 细胞过程的细胞形态观察

我们以与 CEA-TsAb 发生特异结合的结肠癌细胞 SW1116 为靶细胞 (Target cells), 以 PBMC 为效应细胞 (Effect cells), 在体外按照效靶比 (E/T) 为 5 混合, 同时添加一定浓度 (750 ng/ml) 的 CEA-TsAb, 在 37°C 培养 20-40 小时, 再采用 OLYMPUS IMT-2 倒置显微镜观察效应细胞杀伤肿瘤细胞的情况并进行显微照相。使用 40× 物镜在第 20 小时观察并记录, 结果 (图 18) 发现 CEA-TsAb 介导效应细胞杀伤肿瘤细胞的过程可以分为以下四个步骤: 首先靶细胞逐渐由贴壁变为脱落 (图 18B); 然后效应细胞聚集在肿瘤细胞的表面 (图 18C); 随着聚集的效应细胞数目的增加, 肿瘤细胞表面开始出现突起 (图 18D); 最后, 细胞的边缘越来越模糊, 直至细胞完全破碎死亡 (图 18E、F、G)。

实施例 10: CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤 SW1116 细胞过程中, T 淋巴细胞增殖的 MTT 检测

30 我们采用 MTT 方法检测 T 细胞的增殖, 以此评估在 CEA-TsAb 介导 T

淋巴细胞杀伤 SW1116 细胞过程中, T 细胞的活化情况, 具体操作如下:

(1) 提取收集 PBMC, 具体操作与实施例 7 相同。

(2) 培养收集 SW1116 细胞, 具体操作与实施例 6 相同。

(3) 使用 L15 培养基调整 SW1116 细胞的浓度为 $10^6/\text{ml}$, 然后添加丝裂霉素 C (终浓度为 25 g/ml , SIGMA 公司), 37°C CO_2 (5%) 孵箱孵育 20 分钟后, 使用 PBS 洗 3 次, 除去残余的丝裂霉素 C 备用。

(4) 使用 L15 培养基调整效应细胞和靶细胞的浓度: PBMC 为 5×10^5 个/ml; SW1116 为 1×10^5 个/ml。混匀后, 100 μl /孔加入到 96 孔细胞培养板 (Nunc 公司) 中。同时使用 L15 培养基调整 CEA-TsAb 的浓度 (抗体使用浓度是终浓度的 5 倍, 例如终浓度是 $1 \mu\text{g/ml}$, 则此步抗体浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$), 以 50 μl /孔加入到已经加有效应细胞和靶细胞的 96 孔细胞培养板中, 然后在 37°C 的 CO_2 (5%) 培养箱中, 培养 4 天。设立不加抗体的对照, 单独效应细胞或靶细胞的对照以及不加任何细胞的培养基对照。上述检测样品均为 4 复孔。

(5) 1,000g 离心 10 分钟, 将细胞培养基上清弃掉, 使用 PBS (300 μl /孔) 悬浮细胞沉淀, 再次 1,000g 离心 10 分钟, 弃离心上清, 再加入 MTT 溶液 (浓度: 25 g/ml , 200 μl /孔), 37°C 孵育 4 小时后, 使用 PBS (300 μl /孔) 洗板一次, 加入 DMSO (二甲基亚砷, 200 μl /孔) 并 37°C 孵育 30 分钟后, 测定 A_{600} 。

(6) 特异刺激指数 (SI: specific index) 的计算公式为:

$$\text{SI} = [\text{A}_{600}(\text{E/T/A}) / \text{A}_{600}(\text{E/T})]$$

$\text{A}_{600}(\text{E/T})$: 不加抗体的对照孔的 A_{600} 测定值;

$\text{A}_{600}(\text{E/T/A})$: 加抗体的样品孔的 A_{600} 测定值;

如图 17 所示, 随着 CEA-TsAb 的浓度变化, SI 的变化分为三个阶段:

阶段 1: 抗体浓度在 1.5 g/ml - 12 g/ml 之间, SI 与抗体浓度呈正相关变化, 在 1.5 g/ml 达到最低; 阶段 2: SI 与抗体浓度呈负相关变化, 在 47ng/ml 左右达到最高; 阶段 3: 在小于 47ng/ml 时, SI 与抗体浓度呈正相关变化, 在 0.7ng/ml 时 SI 最低。该结果表明在较低的抗体浓度时, CEA-TsAb 仍然具有活化 T 淋巴细胞的能力。将 SI 的变化规律与肿瘤细胞特异杀伤率的变化规律相比较, 我们还发现: CEA-TsAb 介导 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞

的效率与 T 细胞的活化程度直接相关, T 细胞活化程度越高, 杀伤肿瘤细胞的效率越高。

综合实施例 4、5、6、7、8、9 的实验结果, 我们认为在上述杀伤过程中, CEA-TsAb 的作用主要体现在两个方面: 在肿瘤细胞和效应细胞 (T 淋巴细胞) 之间建立直接联系, 即发挥导向作用; 通过活化聚集在肿瘤细胞周围的效应细胞, 发挥杀伤肿瘤细胞的功能。该作用总结为如图 19 所示的机制模型。即当 CEA-TsAb 应用于人体后, 与 T 淋巴细胞和表达 CEA 的肿瘤细胞均能发生特异结合作用, 结果起到将 T 淋巴细胞导向至肿瘤细胞的附近的作用。同时 CEA-TsAb 通过与 CD3 和 CD28 发生特异结合活化 T 细胞。活化的 CTL 细胞将直接杀伤肿瘤细胞, 而活化的 TH 细胞通过分泌细胞因子 (如 IL-2、IFN- γ 等), 辅助活化 CTL、NK 细胞等细胞免疫的效应细胞, 间接杀伤肿瘤细胞。

实施例 11: CEA-TsAb 介导的 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的杀伤机制的检测

活化的 CTL 细胞可以通过三种途径杀伤肿瘤细胞: 一种途径是通过分泌穿孔素在肿瘤细胞表面制造微孔, 导致细胞破碎而坏死; 另外活化的 CTL 细胞分泌的颗粒酶由上述微孔进入肿瘤细胞内, 诱导肿瘤细胞凋亡; 还可以通过活化 CTL 细胞表面诱导表达的 FASL 与肿瘤细胞表面的 FAS 相互作用, 诱导肿瘤细胞凋亡。为了具体分析 CEA-TsAb 介导的 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的杀伤机制, 我们采用 PI (碘化丙锭) 和 FITC 偶联的 Annexin-V (均购自 BD 公司) 标记被杀伤的肿瘤细胞, 然后采用荧光显微镜和 FACS 来观察和检测肿瘤细胞坏死和凋亡的产生情况和相互比例。具体操作如下:

- (1) 提取收集 PBMC, 具体操作与实施例 7 相同。
- (2) 培养收集 SW1116 细胞, 具体操作与实施例 6 相同。
- (3) 使用 L15 培养基调整效应细胞和靶细胞的浓度: PBMC 和 SW1116 均为 1×10^5 个/ml。混匀后, 1.0ml/孔加入到 48 孔细胞培养板 (Nunc 公司) 中。同时使用 L15 培养基调整 CEA-TsAb 的浓度为 5 g/ml, 250 μ l/孔加入到细胞培养孔内, 使 CEA-TsAb 的使用浓度为 1 g/ml。在 37°C 的 CO₂ (5%) 培养箱中培养 20 小时。设立不加抗体的对照, 单独效应细胞以及单独靶

细胞的对照。

(4) 将 48 孔细胞培养板 1,000g 离心 10 分钟后, 弃培养基上清, 使用 0.3% 胰酶 (Sigma 公司) (w/v) 消化贴壁细胞 1 分钟 (50 l/孔), 补加 10% 新生牛血清的 RPMI1640 (1ml/孔), 将细胞轻轻吹打成细胞悬浮液, 转移到 1.5ml 离心管中, 1,000g 离心 10 分钟。

(5) 使用 PBS (500 l/管) 洗细胞一次, 再加入结合缓冲液 (购自 BD 公司) (100 l/管) 悬浮细胞沉淀, 每管补加 5 l PI 溶液 (50. g/ml) 和 3 l FITC-Annexin-V 溶液, 4℃避光 15 分钟。

(6) 每管补加 300 l 结合缓冲液, 取少量细胞制细胞压片, 采用 Leica DMRA2 荧光显微镜观察杀伤的肿瘤细胞的形态和荧光标记状况。使用 QFISH 软件 (Leica 公司) 进行分析。结果如图 20 所示。

(7) 使用 BD FACS Calibur 进行双色荧光检测 (FL1 和 FL2)。条件: 共收集 20,000 个细胞, 激发光波长为 488nmol/L, 结果如图 21 所示

图 21 显示了早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞的差别。早期凋亡细胞表面仅有绿色荧光 (FITC), 晚期凋亡细胞表面同时存在绿色和红色 (PI) 两种荧光, 坏死细胞表面主要是红色荧光, 同时伴有少量绿色荧光。

在图 21 的上图中, 四个分区分别代表四种不同状态的细胞: 左下区为存活的肿瘤细胞; 右下区为早期凋亡细胞; 右上区为晚期凋亡细胞; 左上区为坏死细胞。不添加抗体的对照样品中四种状态的细胞比例依次为 90.17%、1.66%、2.23%、5.94%; 添加抗体后, 四种状态的细胞比例依次为 52.83%、16.12%、21.25%、9.86%。该结果显示, 在添加 CEA-TsAb 后, 活化的 T 淋巴细胞通过诱导肿瘤细胞坏死和凋亡发挥杀伤效应; 与不加抗体的对照相比, 早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞的比例均提高了近 9 倍, 坏死细胞的比例提高了一倍。

参考文献

1. Baxter, A. G., and Hodgkin, P. D. (2002) Activation rules: the

- two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol* 2, 439-446
2. Bernard, A., Lamy, and Alberti, I. (2002) The two-signal model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation* 73, S31-35
 3. Foss, F. M. (2002) Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 29, 5-11
 4. Daniel, P. T., Kroidl, A., Kopp, J., Sturm, I., Moldenhauer, G., Dorken, B., and Pezzutto, A. (1998) Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood* 92, 4750-4757
 5. Holliger, P., Manzke, O., Span, M., Hawkins, R., Fleischmann, B., Qinghua, L., Wolf, J., Diehl, V., Cochet, O., Winter, G., and Bohlen, H. (1999) Carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell activation in colon carcinoma induced by anti-CD3 x anti-CEA bispecific diabodies and B7 x anti-CEA bispecific fusion proteins. *Cancer Res* 59, 2909-2916
 6. Loffler, A., Kufer, P., Lutterbuse, R., Zettl, F., Daniel, P. T., Schwenkenbecher, J. M., Riethmuller, G., Dorken, B., and Bargou, R. C. (2000) A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95, 2098-2103
 7. Manzke, O., Tesch, H., Borchmann, P., Wolf, J., Lackner, K., Gossmann, A., Diehl, V., and Bohlen, H. (2001) Locoregional treatment of low-grade B-cell lymphoma with CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation. I. Clinical phase I evaluation. *Int J Cancer* 91, 508-515
 8. Manzke, O., Tesch, H., Lorenzen, J., Diehl, V., and Bohlen,

- H. (2001) Locoregional treatment of low-grade B-cell lymphoma with CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation. II. Assessment of cellular immune responses. *Int J Cancer* 91, 516-522
- 5 9. Dreier, T., Lorenczewski, G., Brandl, C., Hoffmann, P., Syring, U., Hanakam, F., Kufer, P., Riethmuller, G., Bargou, R., and Baeuerle, P. A. (2002) Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific
- 10 antibody. *Int J Cancer* 100, 690-697
10. Dreier, T., Baeuerle, P. A., Fichtner, I., Grun, M., Schlereth, B., Lorenczewski, G., Kufer, P., Lutterbuse, R., Riethmuller, G., Gjorstrup, P., and Bargou, R. C. (2003) T cell
- 15 costimulus-independent and very efficacious inhibition of tumor growth in mice bearing subcutaneous or leukemic human B cell lymphoma xenografts by a CD19-/CD3- bispecific single-chain antibody construct. *J Immunol* 170, 4397-4402
11. Loffler, A., Gruen, M., Wuchter, C., Schriever, F., Kufer, P., Dreier, T., Hanakam, F., Baeuerle, P. A., Bommer, K.,
- 20 Karawajew, L., Dorken, B., and Bargou, R. C. (2003) Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct. *Leukemia* 17, 900-909
12. Min Fang, X. J., Zhi Yang, Cong-Xiao Yu, Cheng-Chang Yin, Hua Li, Rui Zhao, Zhang-Zhang, Qin-Lin, Hua-Liang Huang. (2003)
- 25 Effect of inter-linker on the activaty of single chain bispecific antibody. *Chines science bulletin*, 48, 1912-1918
13. Fang, M., Zhao, R., Yang, Z., Zhang, Z., Li, H., Zhang, X. T., Lin, Q., and Huang, H. L. (2004) Characterization of an
- 30 anti-human ovarian carcinomaxanti-human CD3 bispecific

single-chain antibody with an albumin-original interlinker.
Gynecol Oncol 92, 135-146

14. Jung, G., Brandl, M., Eisner, W., Fraunberger, P., Reifenberger, G., Schlegel, U., Wiestler, O. D., Reulen, H. J., and Wilmanns, W. (2001) Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy. *Int J Cancer* 91, 225-230
- 10 15. Kodama, H., Suzuki, M., Katayose, Y., Shinoda, M., Sakurai, N., Takemura, S., Yoshida, H., Saeki, H., Asano, R., Ichiyama, M., Imai, K., Hinoda, Y., Matsuno, S., and Kudo, T. (2002) Specific and effective targeting cancer immunotherapy with a combination of three bispecific antibodies. *Immunol Lett* 81, 99-106
- 15 16. Jung, G., Freimann, U., Von Marschall, Z., Reisfeld, R. A., and Wilmanns, W. (1991) Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments. *Eur J Immunol* 21, 2431-2435
- 20 17. Tutt, A., Stevenson, G. T., and Glennie, M. J. (1991) Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol* 147, 60-69
- 25 18. French, R. R. (1998) Production of bispecific and trispecific F(ab)₂ and F(ab)₃ antibody derivatives. *Methods Mol Biol* 80, 121-134
19. Wong, W. M., Vakis, S. A., Ayre, K. R., Ellwood, C. N., Howell, W. M., Tutt, A. L., Cawley, M. I., and Smith, J. L. (2000) Rheumatoid arthritis T cells produce Th1 cytokines in response to stimulation with a novel trispecific antibody directed
- 30

- against CD2, CD3, and CD28. *Scand J Rheumatol* 29, 282-287
20. Atwell, J. L., Breheney, K. A., Lawrence, L. J., McCoy, A. J., Kortt, A. A., and Hudson, P. J. (1999) scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker
5 between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng* 12, 597-604
21. Dolezal, O., Pearce, L. A., Lawrence, L. J., McCoy, A. J., Hudson, P. J., and Kortt, A. A. (2000) ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in
10 single-chain Fv fragment assembled in V(L) to V(H) orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers. *Protein Eng* 13, 565-574
22. Schoonjans, R., Willems, A., Grooten, J., and Mertens, N. (2000) Efficient heterodimerization of recombinant bi- and
15 trispecific antibodies. *Bioseparation* 9, 179-183
23. Schoonjans, R., Willems, A., Schoonooghe, S., Fiers, W., Grooten, J., and Mertens, N. (2000) Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives. *J Immunol*
20 165, 7050-7057
24. Kortt, A. A., Dolezal, O., Power, B. E., and Hudson, P. J. (2001) Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer
targeting. *Biomol Eng* 18, 95-108
25. Schoonjans, R., Willems, A., Schoonooghe, S., Leoen, J., Grooten, J., and Mertens, N. (2001) A new model for
25 intermediate molecular weight recombinant bispecific and trispecific antibodies by efficient heterodimerization of single chain variable domains through fusion to a Fab-chain. *Biomol Eng* 17, 193-202
- 30 26. Willems, A., Leoen, J., Schoonooghe, S., Grooten, J., and

- Mertens, N. (2003) Optimizing expression and purification from cell culture medium of trispecific recombinant antibody derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 786, 161-176
- 5 27. Song, L. P., Cheng, J. L., Wang, X. B., Zhang, Z., Fang, M., Zhou, Z. Y., and Huang, H. L. (2003) A new model of trispecific antibody resulting the cytotoxicity directed against tumor cells. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35, 503-510
- 10 28. Zhang, Z., Song, L. P., Fang, M., Wang, F., He, D., Zhao, R., Liu, J., Zhou, Z. Y., Yin, C. C., Lin, Q., and Huang, H. L. (2003) Production of soluble and functional engineered antibodies in *Escherichia coli* improved by FkpA. *Biotechniques* 35, 1032-1038, 1041-1032
- 15 29. Shi, Z. R., Tsao, D., and Kim, Y. S. (1983) Subcellular distribution, synthesis, and release of carcinoembryonic antigen in cultured human colon adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 43, 4045-4049
- 20 30. Ganjei, P., Nadjai, M., Albores-Saavedra, J., and Morales, A. R. (1988) Histologic markers in primary and metastatic tumors of the liver. *Cancer* 62, 1994-1998
- 25 31. Horie, Y., Miura, K., Matsui, K., Yukimasa, A., Ohi, S., Hamamoto, T., and Kawasaki, H. (1996) Marked elevation of plasma carcinoembryonic antigen and stomach carcinoma. *Cancer* 77, 1991-1997
32. Kuo, W. R., Tsai, S. M., Jong, S. B., and Juan, K. H. (1996) Significance of tumour markers in nasopharyngeal carcinoma. *J Otolaryngol* 25, 32-36
- 30 33. Feil, G., Wechsel, H. W., Nelde, H. J., and Bichler, K. H. (1999) Immunohistological investigations of carcinoembryonic

- antigen (CEA) in urothelial carcinomas. *Anticancer Res* 19, 2591-2597
34. Tomita, Y., Arakawa, F., Hirose, Y., Liao, S., Khare, P. D., Kuroki, M., Yamamoto, T., and Ariyoshi, A. (2000) Carcinoma-associated antigens MK-1 and CEA in urological cancers. *Anticancer Res* 20, 793-797
35. Kammerer, U., Thanner, F., Kapp, M., Dietl, J., and Sutterlin, M. (2003) Expression of tumor markers on breast and ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res* 23, 1051-1055
36. Hengen, P. (1995) Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 20, 285-286
37. Fan, H., Villegas, C., Chan, A. K., and Wright, J. A. (1998) Myc-epitope tagged proteins detected with the 9E10 antibody in immunofluorescence and immunoprecipitation assays but not in western blot analysis. *Biochem Cell Biol* 76, 125-128
38. Zhang, Z., Li, Z. H., Wang, F., Fang, M., Yin, C. C., Zhou, Z. Y., Lin, Q., and Huang, H. L. (2002) Overexpression of DsbC and DsbG markedly improves soluble and functional expression of single-chain Fv antibodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 26, 218-228
39. Cheng, J., Wang, X., Zhang, Z., and Huang, H. (2002) Construction and expression of a reshaped VH domain against human CD28 molecules. *Prep Biochem Biotechnol* 32, 239-251
40. Koga, H., Kanda, H., Nakashima, M., Watanabe, Y., Endo, K., and Watanabe, T. (1990) Mouse-human chimeric monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (CEA): in vitro and in vivo activities. *Hybridoma* 9, 43-56
41. Nakamura, Y., Gojobori, T., and Ikemura, T. (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 28, 292

01-04-01

SEQUENCE LISTING

<110> 北京安波特基因技术有限公司

<120> 基因工程重组抗 CEA 抗 CD3 抗 CD28 单链三特异抗体

<130> I040179

<160> 52

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10						15	

Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		

01-01-01

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Gly Asp Val Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Thr Thr Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro
115 120 125

Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn Ser Gly Ser Arg Asp Ile Val Leu
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr
145 150 155 160

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Thr Tyr
165 170 175

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190

Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu
210 215 220

Glu Asp Thr Ala Tyr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Arg
225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250

<210> 2

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

0000000000

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Asp Ile Gln
130 135 140

Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
145 150 155 160

Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp
165 170 175

Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
180 185 190

Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser
195 200 205

Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile
210 215 220

Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Ala
225 230 235 240

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
245 250

01-01-01

<210> 3

<211> 2103

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

atgggtctcg agcaggtgca gctgcagcag agcgggtgcgg aactgatgaa accggggcgcg 60
agcgtgaaaa tcagctgcaa agcgaccggc tataccttca gcgattattg gatcgaatgg 120
gtgaaacage gtccgggtca cggcctggaa tggatcgggtg aaatcctgcc gggcagcggc 180
cgtaccgact acaacgaacg tttcaaaggc aaagcgacct tcaccggcga cgtttctagc 240
aacaccgcgt atatgaaact gtctagcctg accagcgaag atagcgcggt gtattactgc 300
gcgaccggca ccaccccggt cggttactgg ggtcagggca ccctggttac cgtttccgcg 360
actagtacc cagagccataa cagccatcag gtgccgagcg cgggcggccc gaccgcgaac 420
agcggctcta gagacatcgt gctgaccag agcccggcga gcctggcggt gtctctgggt 480
cagcgtgca ccattcctg ccgtgcttc cagtcggtt ccacctctc ctacacctac 540
atgcactggt atcagcagaa accgggtcag ccgccgaaac tgctgatcaa atatgcgagc 600
aacctggaat ctggtgtgcc ggcgcgtttc agcggttctg gcagcggcac cgacttcacc 660
ctgaacatcc acccgggtgga agaagaagat accgcgtatt actattgccg gcactcttgg 720
gaaatcccgc gtaccttcgg tggcggcacc aaactggaaa tcaaagaatt caacagcacg 780
taccgggttg taagcgtcct caccgtactg caccaggact ggctgaatgg caaggaatac 840
aaatgcaaga gtactgaggt gaagctgggt gagtctggac ctgagctggt gaagcctgga 900
gcttcaatga agatatcctg caaggcttct ggttactcat tcaactggcta caccatgaac 960
tgggtgaagc agagtcatgg aaagaacctt gagtggatgg gacttattaa tccttacaaa 1020

ggtgttagta cctacaacca gaagttcaag gacaaggcca cattaactgt agacaagtca 1080
 tccagcacag cctacatgga actcctcagt ctgacatctg aggactctgc agtctattac 1140
 tgtgcaagat cgggttacta cggatgtagt gactggtagt tcgatgtctg gggcgcagga 1200
 acctcagtca ctgtctcctc aactagtggg ggtgggtggg ctgggtgggg tggttctggg 1260
 ggtgggtggg cttctagaga catccagatg acccagacca cactctcctt gtctgcctct 1320
 ctgggagaca gaggcaccat cagttgcagg gcaagtcagg acattagaaa ttatttaaac 1380
 tggatatcaac agaaaccaga tggaactggt aaactcctga tctactacac atcaagatta 1440
 cactcaggag tcccatcaaa gttcagtggc agtgggtctg gaacagatta ttctctcacc 1500
 attagcaacc tggagcaaga ggatattgcc acttactttt gccnacaggg taatagcgtt 1560
 ccgtggacgt tcgctggagg caccaaaactg gaactgaagc gcgctgtcga cttccagaat 1620
 gcgctgtctg ttcgttacac caagaaagta cccaagtgt caactccaac tctgttagag 1680
 gtctcacata tgcaggtaca gctacaggaa tctgggtcgg gtctggtaaa accgtctcag 1740
 accctgtctc tgacctgtac cgtatctggt ttctctctgt ctgactatgg tgttcattgg 1800
 gtacgtcagc cgccaggtaa aggtctggaa tgcttggtg taatatgggg tggaggcacg 1860
 aattataatt cggctctcat gtccagacgt gtaacctctt ccgacgatac ctctaaaaat 1920
 cagttctctc tgaaactgtc ttcgtagac accgtgtat actattgtgc tcgttcctat 1980
 tactattcta tggactactg gggtcagggc accctggtaa ccgtatcttc cgtaccgaa 2040
 caaaaactca tctcagaaga ggatctgaat ggggcgcac atcatcatca ccatcagag 2100
 caa 2103

<210> 4

<211> 701

04-01

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 4

Met Gly Leu Glu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met
1 5 10 15

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr
 20 25 30

Phe Ser Asp Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly
 35 40 45

Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asp Tyr
 50 55 60

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Gly Asp Val Ser Ser
65 70 75 80

Asn Thr Ala Tyr Met Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Thr Thr Pro Phe Gly Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Thr Pro Ser His Asn Ser
 115 120 125

His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn Ser Gly Ser Arg
 130 135 140

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 165 170 175

Ser Tyr Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 180 185 190

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 195 200 205

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 210 215 220

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 225 230 235 240

Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu
 245 250 255

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 260 265 270

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Ser Thr Glu Val Lys
 275 280 285

Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys
 290 295 300

Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
 305 310 315 320

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile
325 330 335

Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys
340 345 350

Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
355 360 365

Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
370 375 380

Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
385 390 395 400

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
405 410 415

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln
420 425 430

Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser
435 440 445

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
450 455 460

Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu
465 470 475 480

His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
485 490 495

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
500 505 510

Phe.Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr
515 520 525

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Val Asp Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
530 535 540

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Pro Val Glu
545 550 555 560

Val Ser His Met Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
565 570 575

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
580 585 590

Leu Ser Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
595 600 605

Leu Glu Cys Leu Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser
610 615 620

Ala Leu Met Ser Arg Arg Val Thr Ser Ser Asp Asp Thr Ser Lys Asn
625 630 635 640

Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
645 650 655

Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
660 665 670

Val Thr Val Ser Ser Gly Thr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 675 680 685

Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His Glu Gln
 690 695 700

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

tataccatgg gtctcgag

18

<210> 6

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

tataccatgg gtctcgagat gtacccgcgc ggtaacacta gtgaattcaa cagcacgta

59

<210> 7

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 7

agccagtcct ggtgcagtac ggtgaggacg cttacaaccc ggtacgtgct gttgaattc 59

<210> 8

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 8

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggaa tacaaatgca agagtacttc tagaatgta 59

<210> 9

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 9

cgaaccagca gcgcattctg gaagtcgacg ttaccgcgcg ggtacattct agaagtact 59

<210> 10

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 10
aatgcgctgc tggttcggtta caccaagaaa gtacccaag tgtcaactcc aactcctgt 59

<210> 11

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 11
gcggtaccgt taccgcgagg gtacatcata tgtgagacct ctacaggagt tggagttga 59

<210> 12

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 12
cgcggtaacg gtaccgcgct ggaagttgac gaaacctacg ttccgaaaga atttaacgc 59

<210> 13

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 13
tcgctagccc catccgcggg atgtcagcgt ggaaggtgaa ggtttccgcg ttaaattcctt 60

tcgg

64

<210> 14

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 14

atcgagctca tgtacccgcg cggtaacgct agcgaacaaa aactcatctc agaagagga 59

<210> 15

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 15

tattgctcgt gatggtgatg atgatgtgcg gcccattca gacctcttc tgagatgag 59

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 16

ctcgacggat ccttattgct cgtgatggtg 30

04-04-01

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 17

taatacgact cactataggg ga

22

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 18

gctagttatt gctcagcgg

19

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 19

tcacatatgc aggtacagct acag

24

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 20

ttcgctagcg gaagatacgg tacca

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 21

aagagtactg aggtgaagct ggtgg

25

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 22

gaagtcgaca ggcgcgttca gttccag

27

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 24

ttcctcgagc aggttcagct

20

<210> 25

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 25

tcgcgcccgg tttcatcagt tccgcaccgc tctgctgcag ctgaacctgc tcgaggaa

58

<210> 26

04-01

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 26

actgatgaan ccgggcgcga gcgtgaaaat cagctgcaaa gcgaccggt ataccttc 58

<210> 27

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 27

caccattcg atccaataat cgctgaaggt atagccggtc gctt 44

<210> 28

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 28

attattggat cgaatgggtg aaacagcgtc cgggtcacgg cctggaatgg atcggtgaa 59

<210> 29

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 29

acgttcgttg tagtcggtac ggccgctgcc cggcaggatt tcaccgatcc attccagg

58

<210> 30

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 30

cgtaccgact acaacgaacg ttccaaggc aaagcgacct tcaccggcga cgtttctagc

60

<210> 31

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 31

ttcgtggtc aggctagaca gttcatata cgcgggtgtg ctagaaacgt cgccggtgaa

60

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 32

tgtctagcct gaccagcgaa gatagcgagg tgtattactg cgcgaccggc accaccccg 59

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 33

gctcacggtc accagggtgc cctgacccca gtaaccgaac ggggtgggtgc cggtcgcgca 60

<210> 34

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 34

gcaccctggt gaccgtgagc gcgactagta ccccgagcca taacagccat caggtgccg 59

<210> 35

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 35
gtctctagag .ccgctgttcg cggtcgggcc gcccgcgctc ggcacctgat ggctgttat 59

<210> 36

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 36
cgaacagcgg ctctagagac atcgtgctga cccagagccc ggcgagcctg gcggtgtc 58

<210> 37

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 37
ctgggaagca cggcaggaga tggtcgcacg ctgaccaga gacaccgcca ggctcgccgg 60

<210> 38

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 38

tctctctgccg tgcttcccag tccgtttcca cctctctcta cacctacatg cactggat 59

<210> 39

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 39

gacacagcagt ttccggcggt gaccgggttt ctctgatac cagtgcattg aggtgt 56

<210> 40

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 40

agccgccgaa actctgatac aaatatgca gcaacctgga atctgggtgt ccggcggt 59

<210> 41

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 41

gttcagggtg aagtcgggtc cgtgccaga accgtgaaa cgcgccgga caccagatt 59

<210> 42

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 42

gcaccgactt caccctgaac atccaccggt tggaagaaga agataccggt tattactat 59

<210> 43

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 43

gccaccgaag gtacgcggga tttcccaaga gtgctggcaa tagtaatacg cggtatctt 59

<210> 44

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 44

tcccgcgtac cticggtggc ggcaccaaac tggaaatcaa agaattcgcc 50

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 45

ggcgaattct ttgatttcca g

21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 46

ggcgaattct ttgatttcca g

21

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 47

agccgccgaa actgctgate

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 48

gatcagcagt ttcggcggct

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 49

cgaacagcgg ctctagagac

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 50

gtctctagag ccgctgttcg

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 51

gtaccgacta caacgaacgt

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 52

acgttcgttg tagtcggtac

20

说明书附图

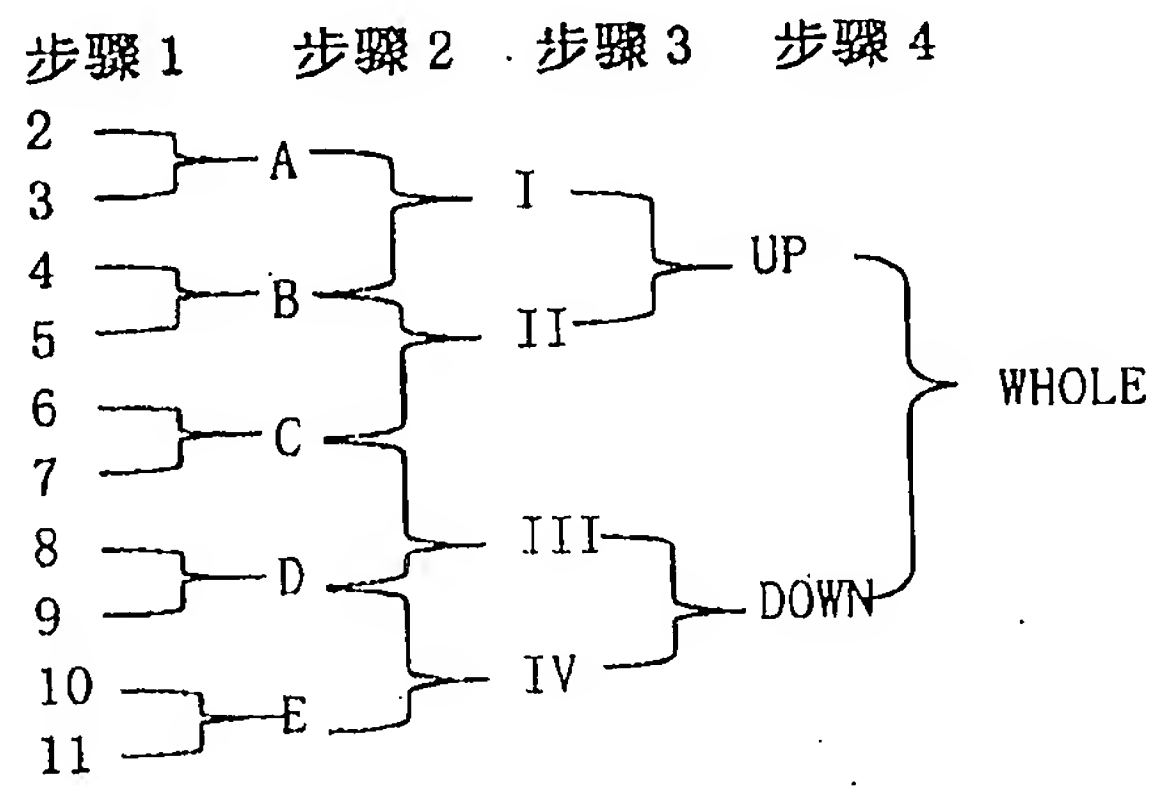


图 1

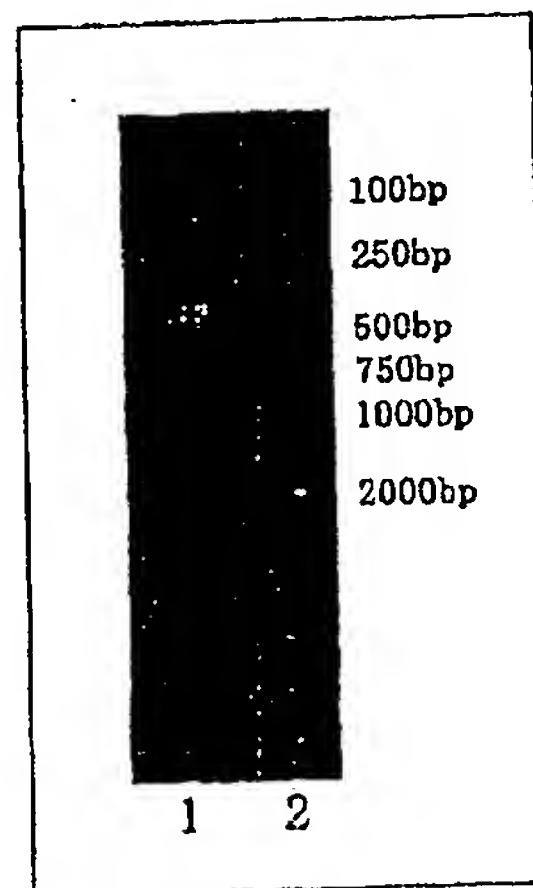


图 2

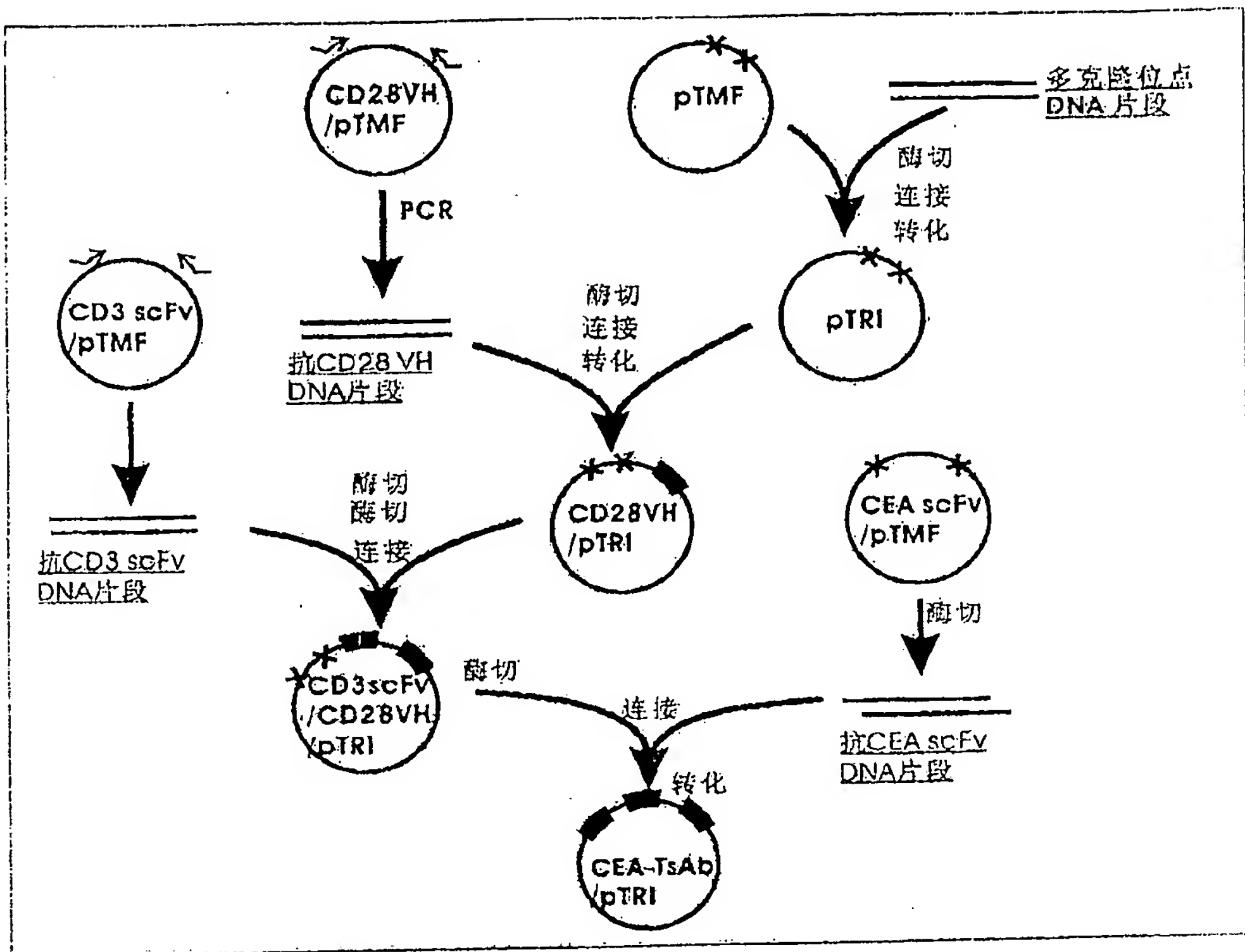


图 4

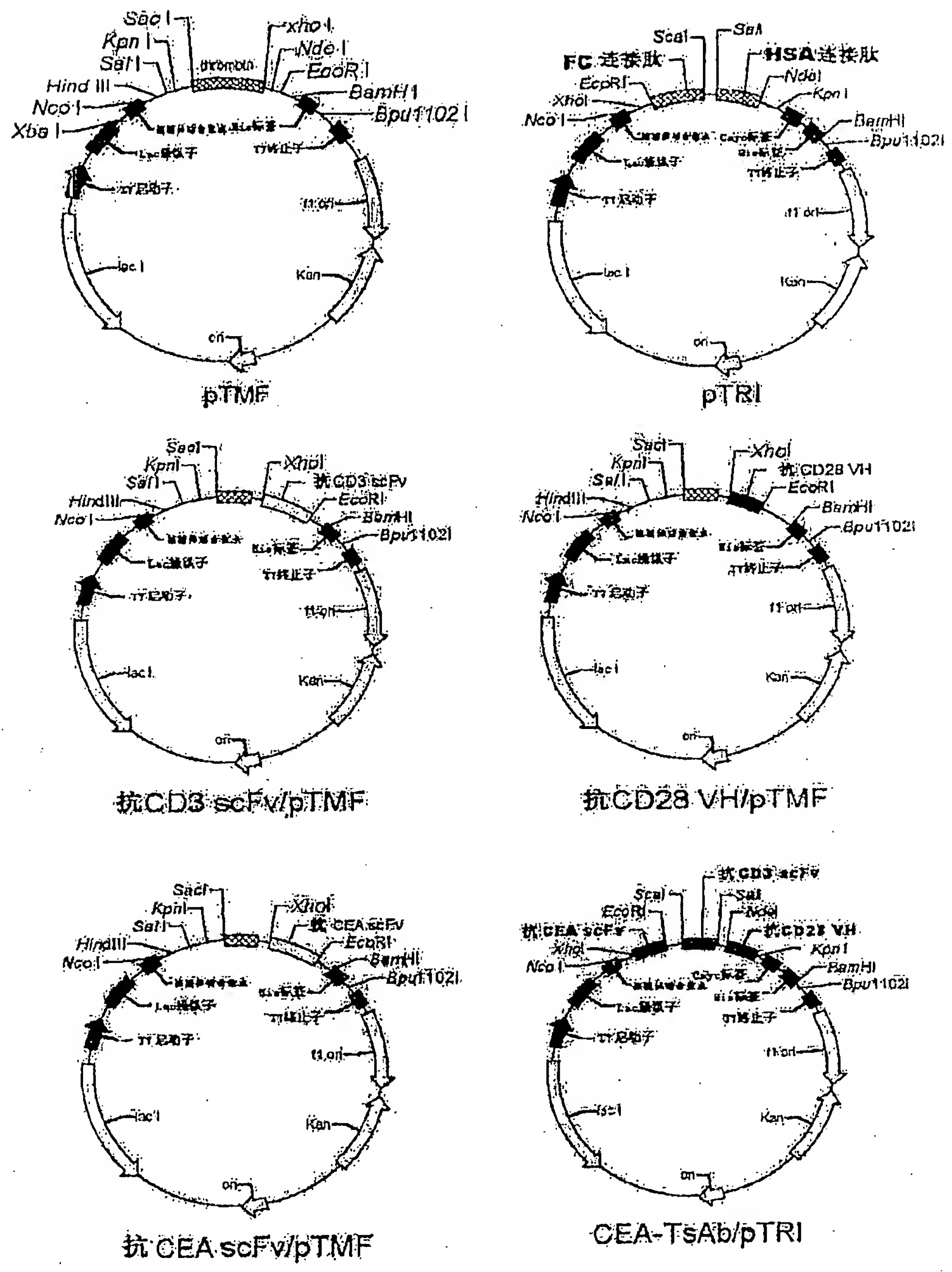


图 5

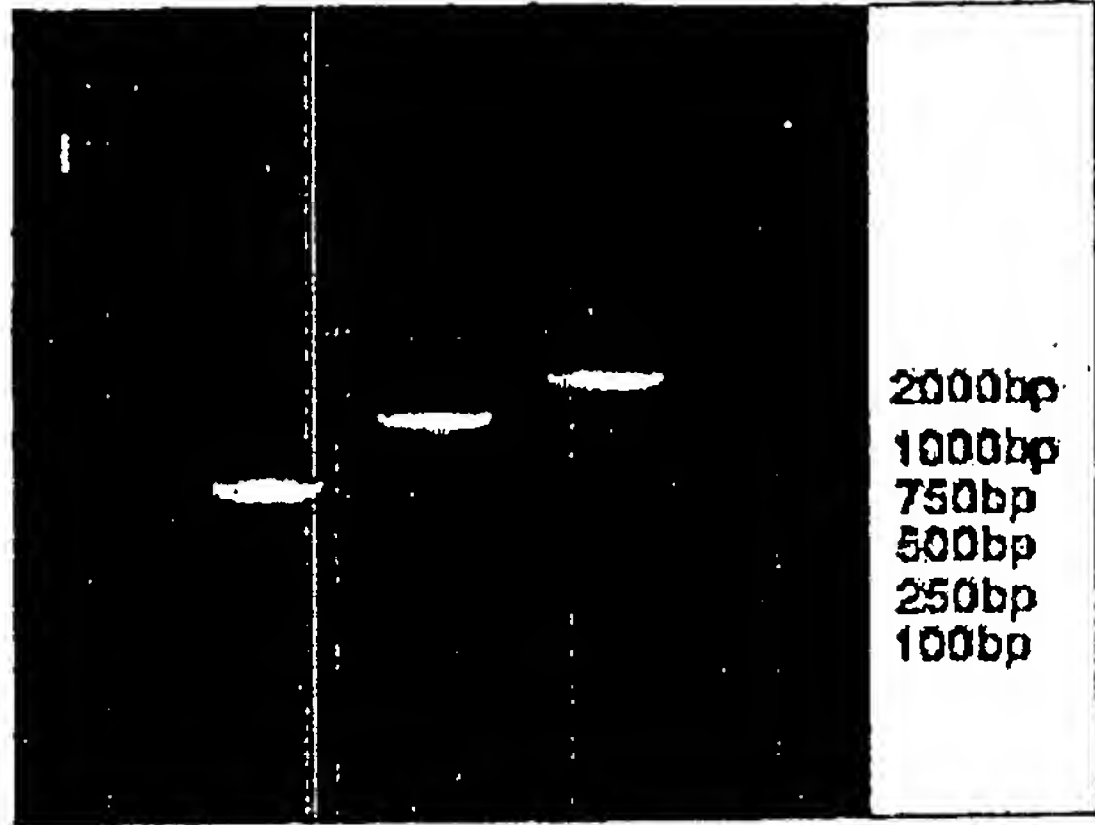


图 6

步骤	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K	
2	a				b		c				d		e				f		g			
3	I						II						III				IV					
4	UP												DOWN									
5	WHOLE																					

图 7

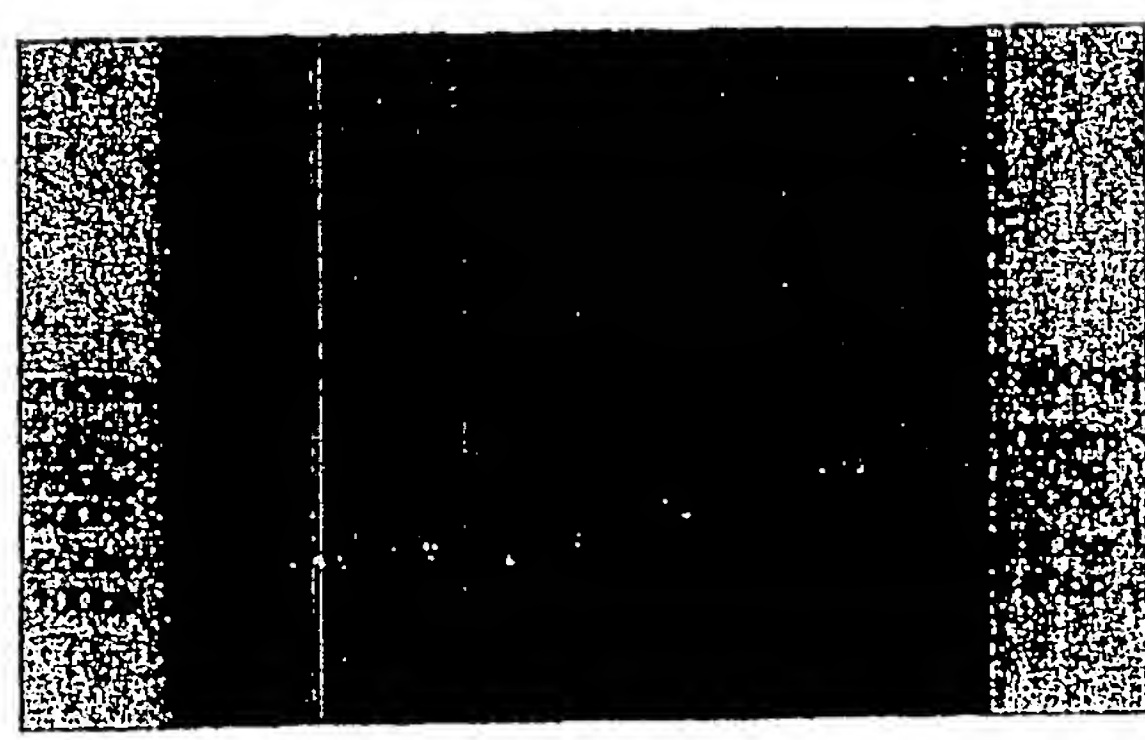


图 8

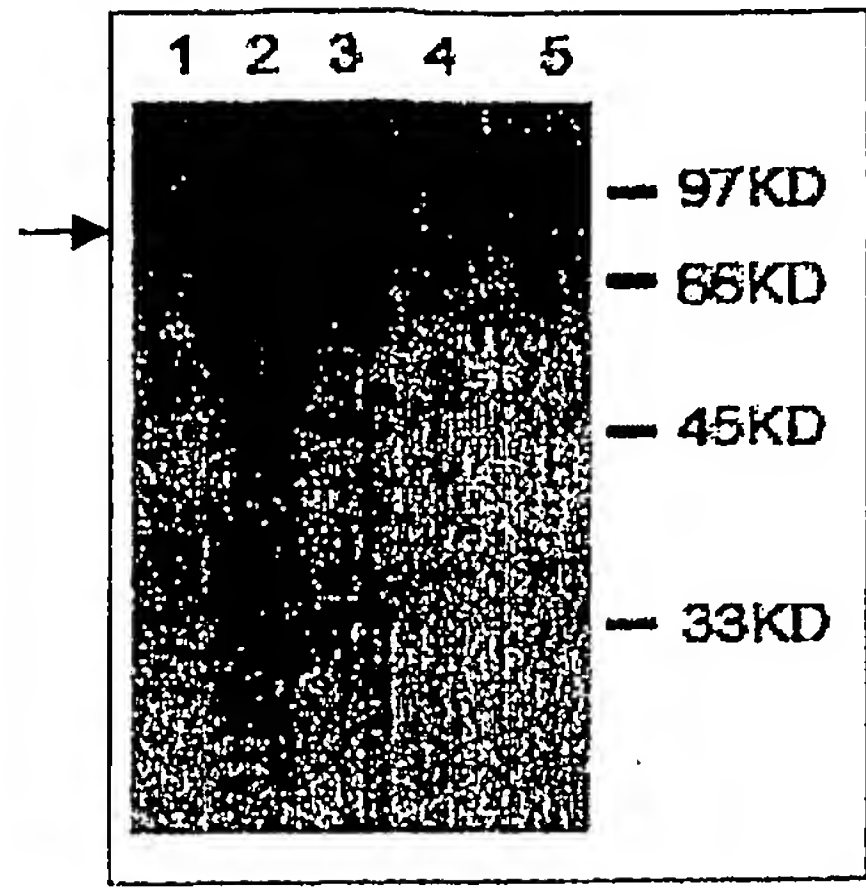


图 9

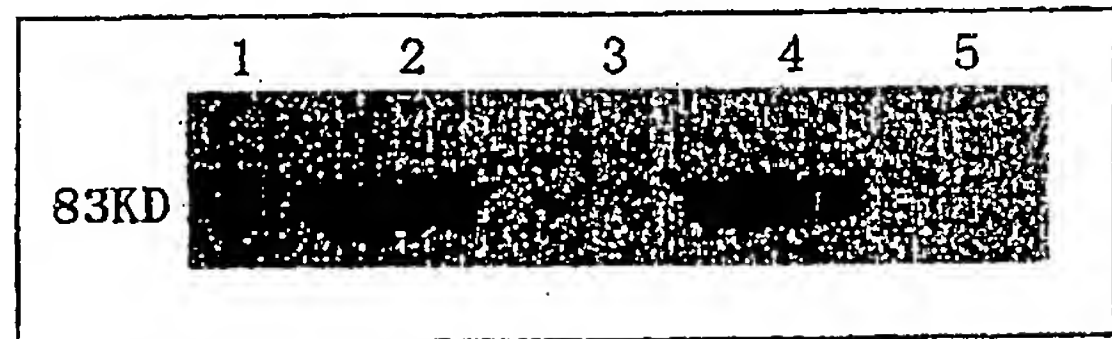


图 10

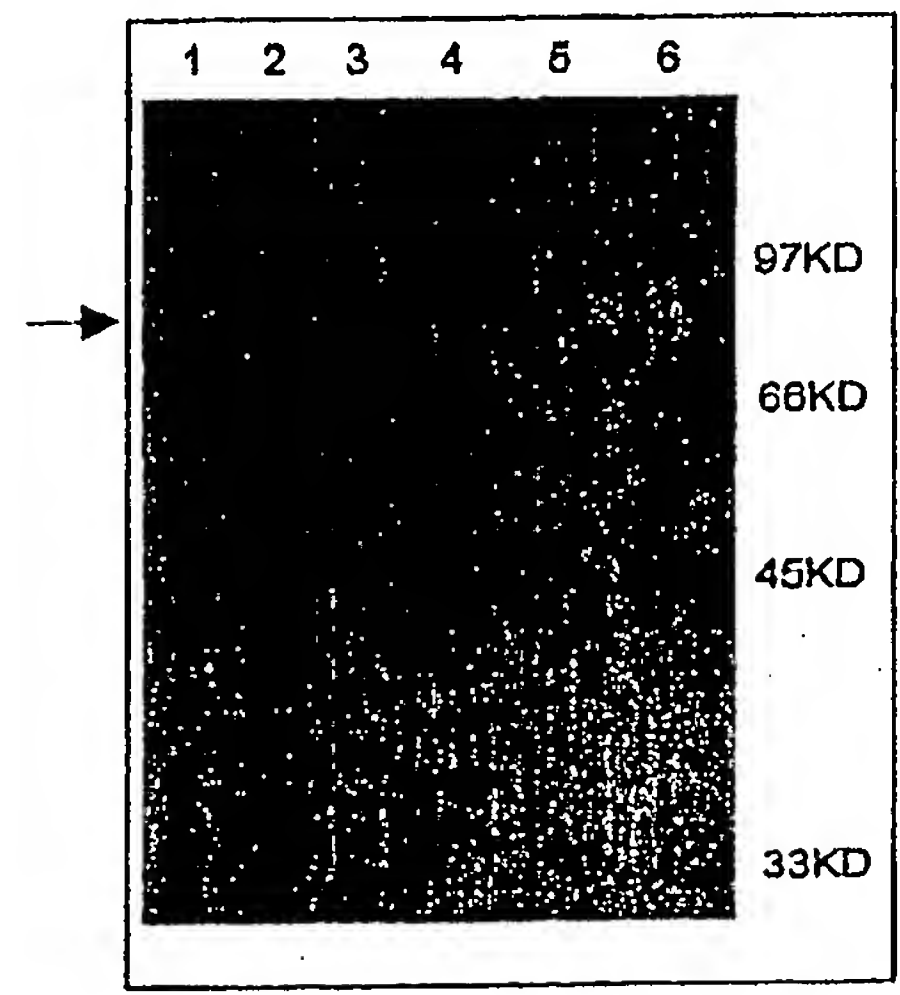


图 11

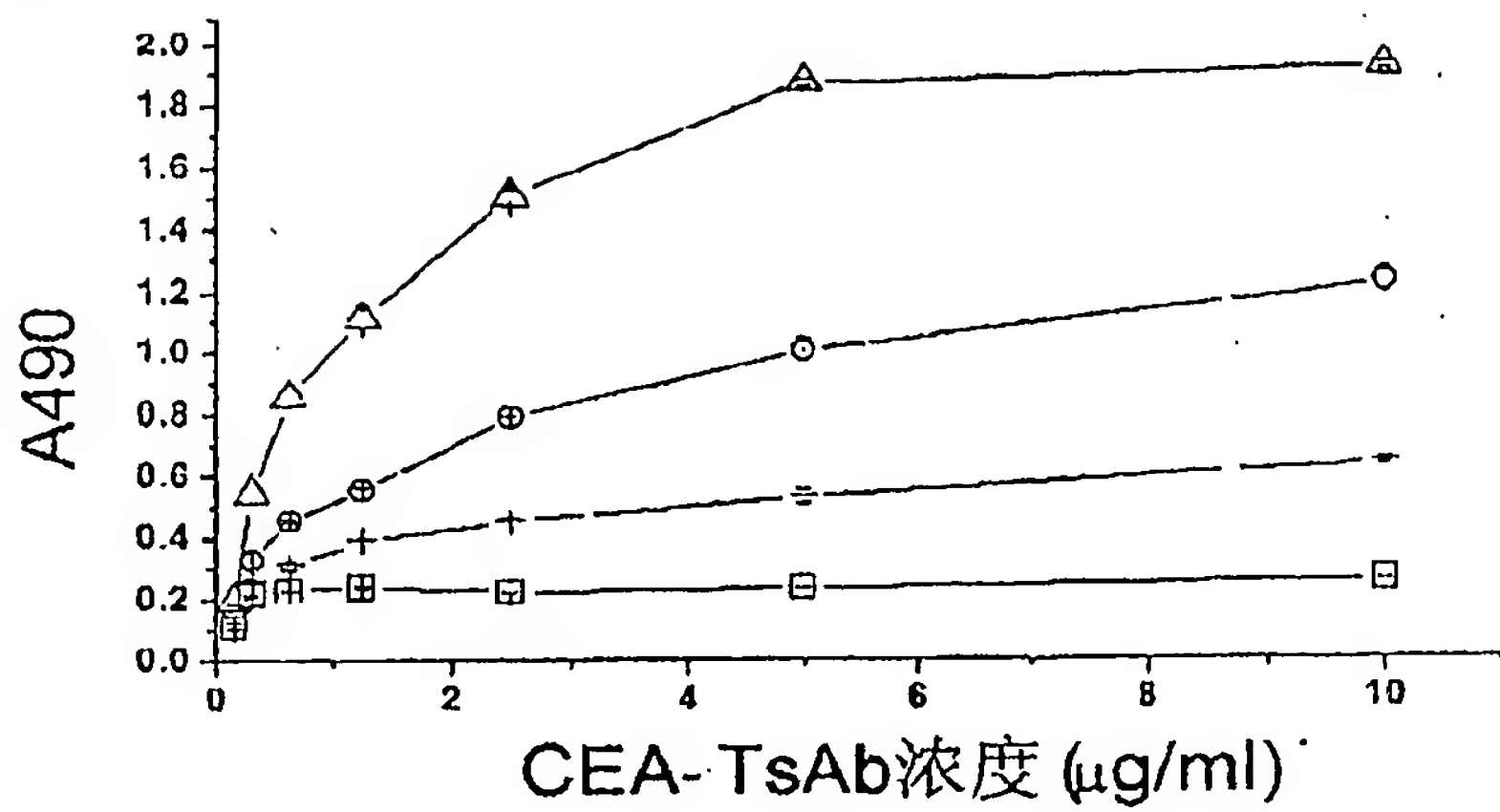


图 12

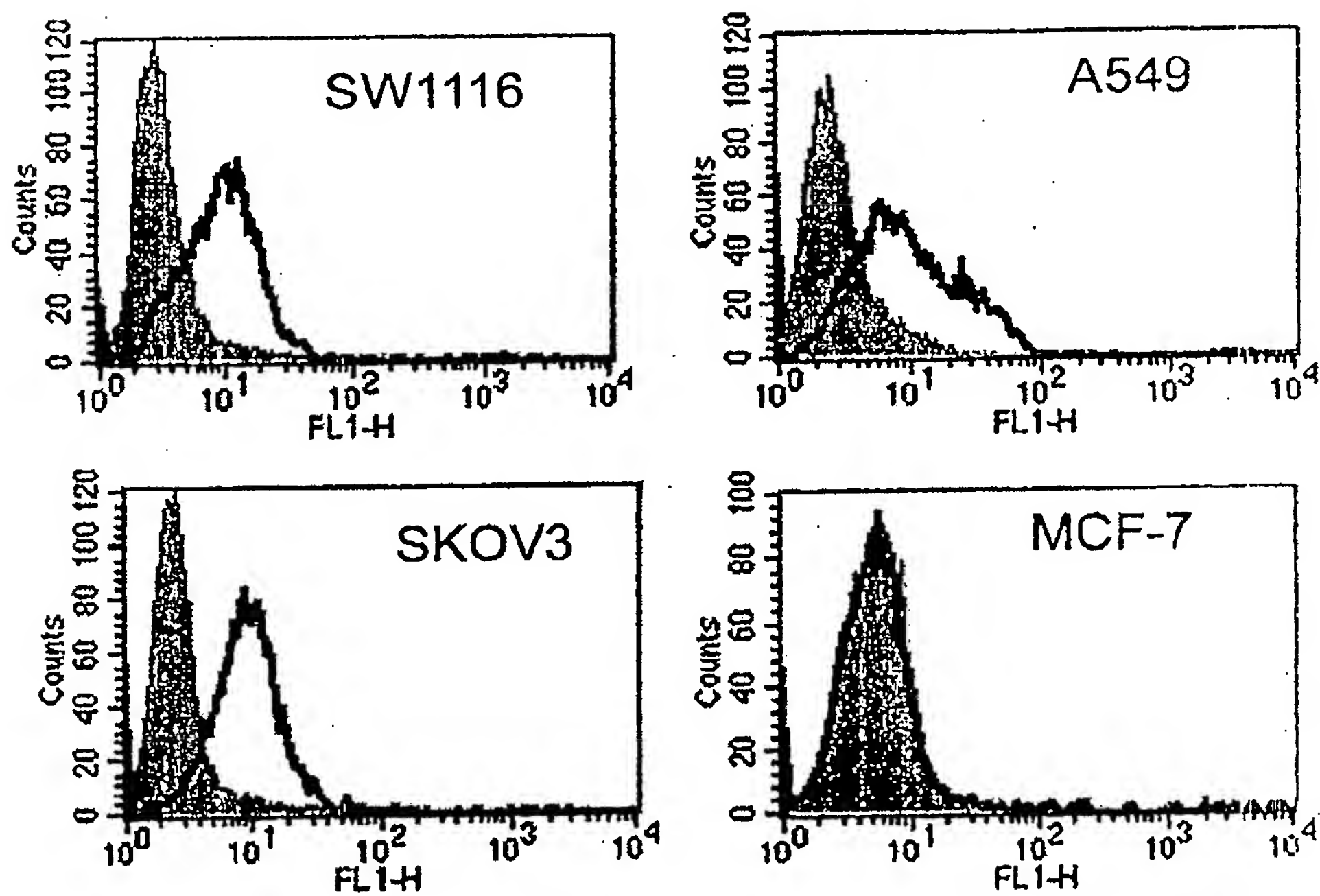


图 13

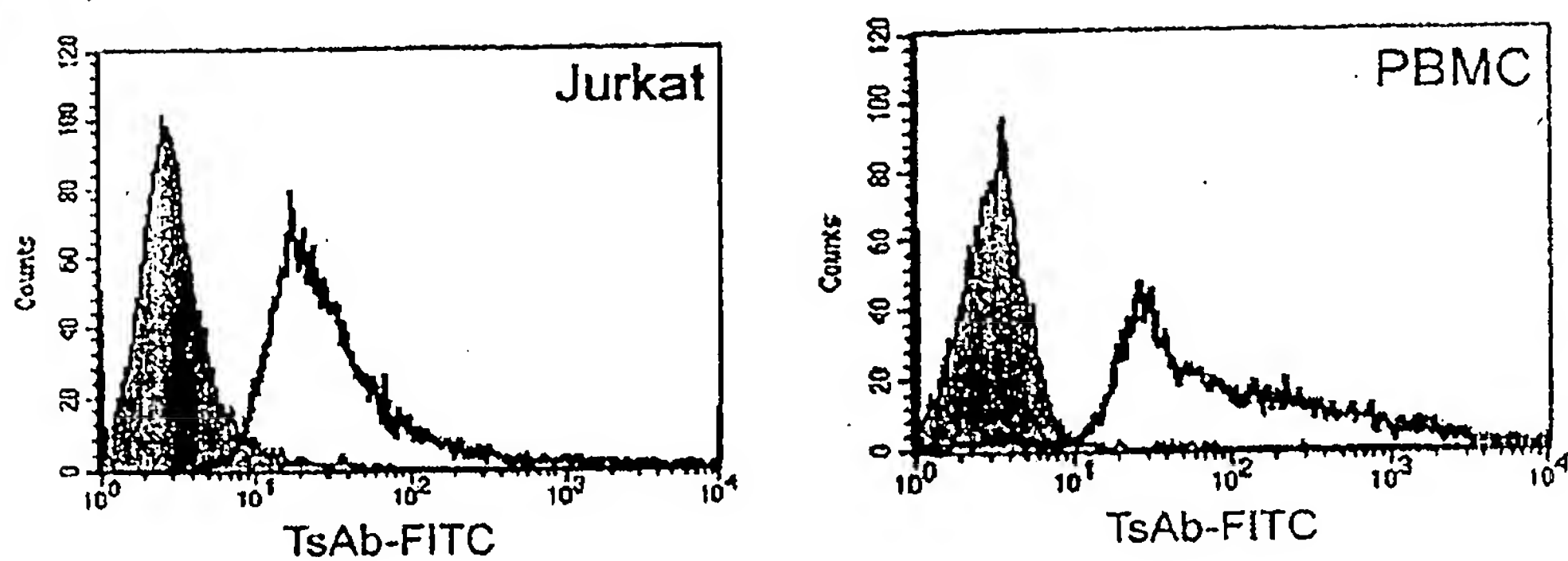


图 14

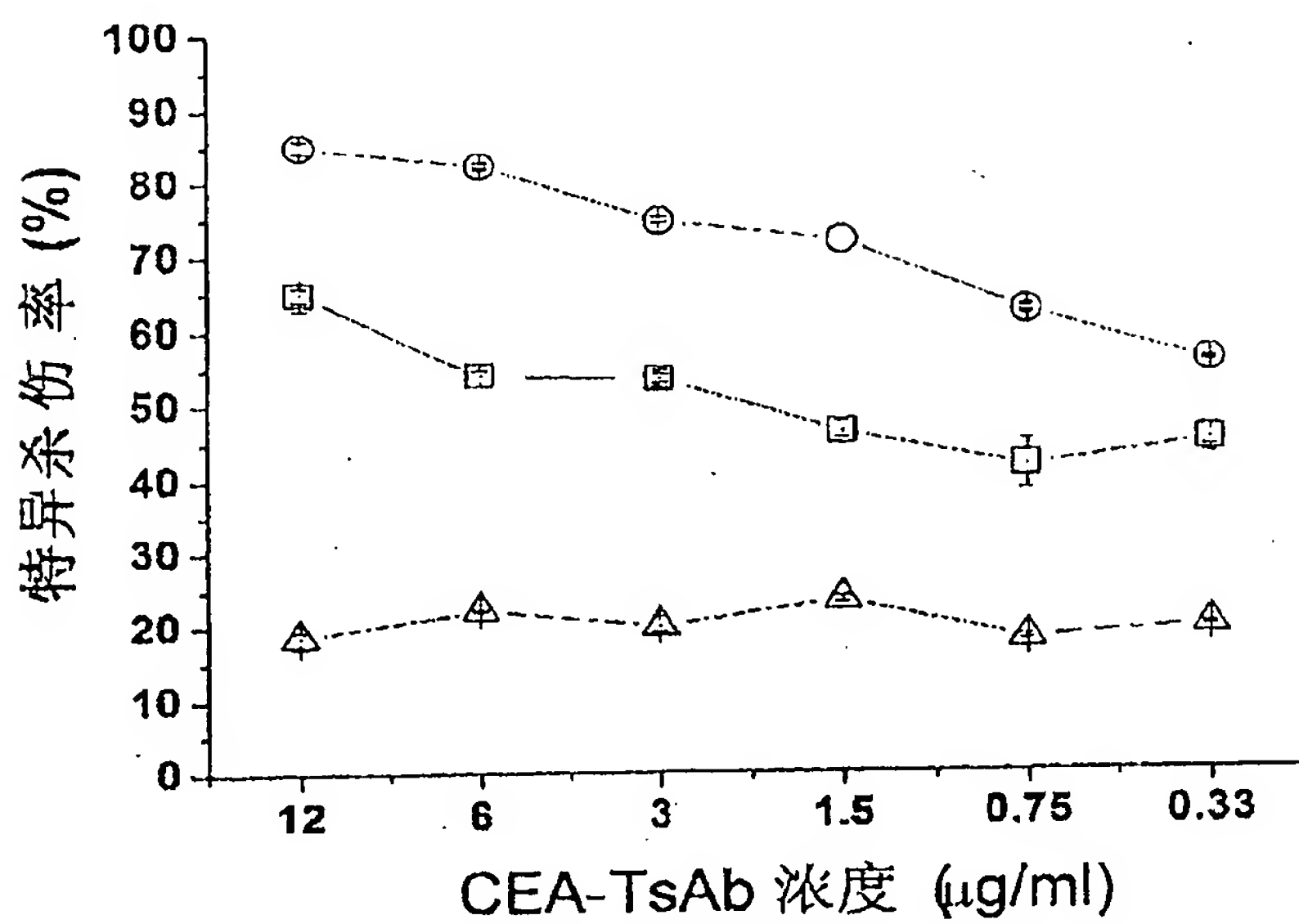


图 15

04-04-01

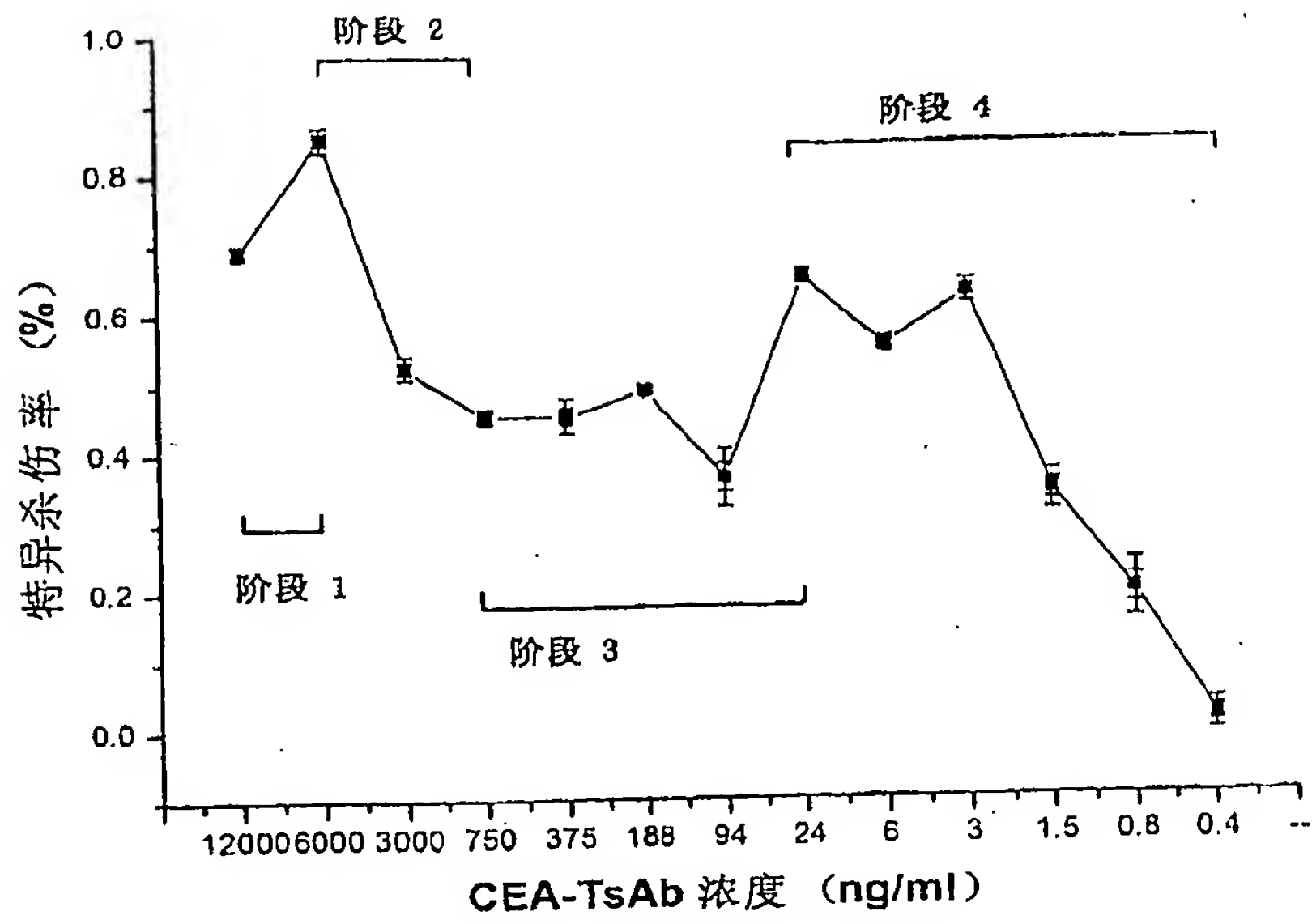


图 16

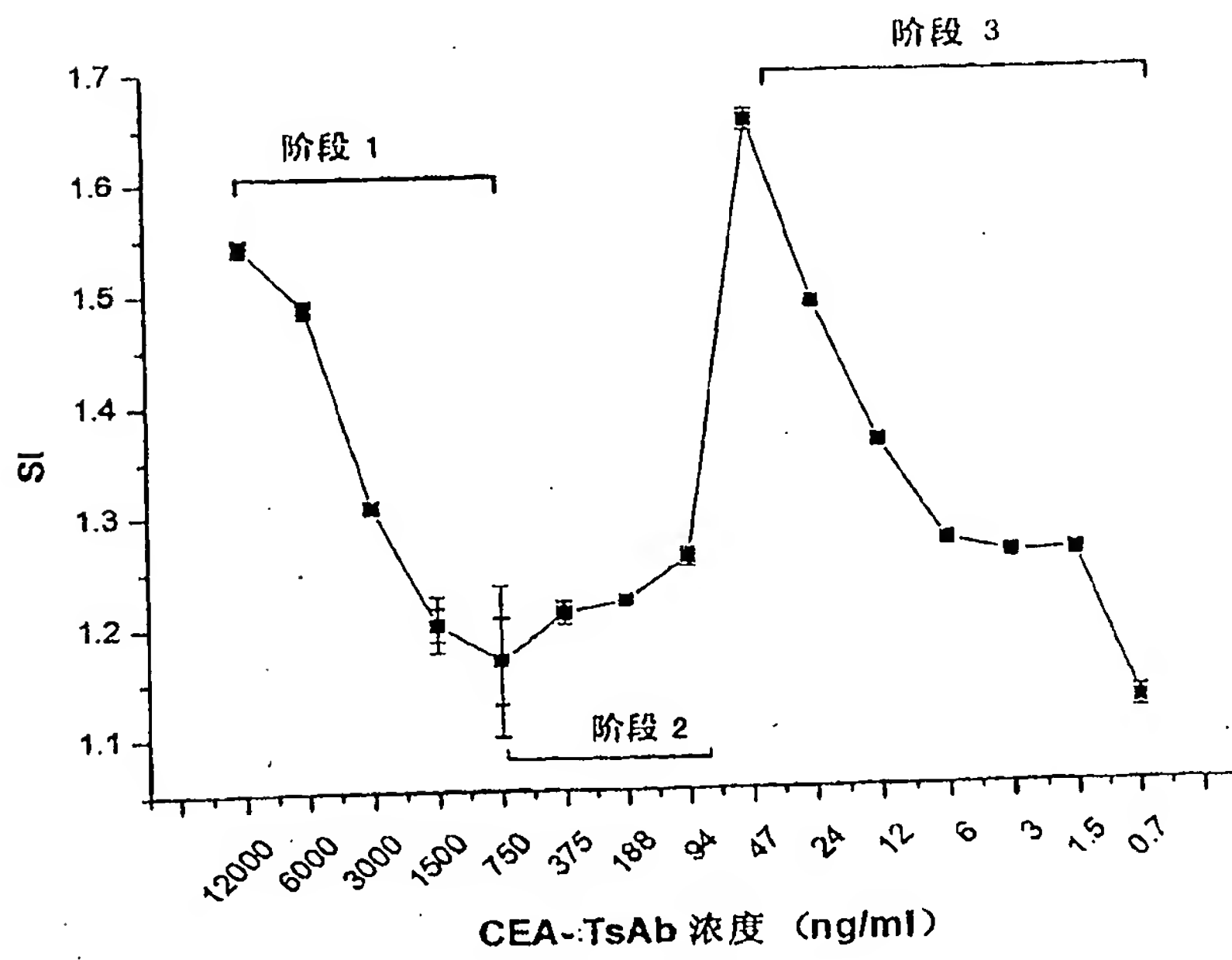


图 17

04-04-01

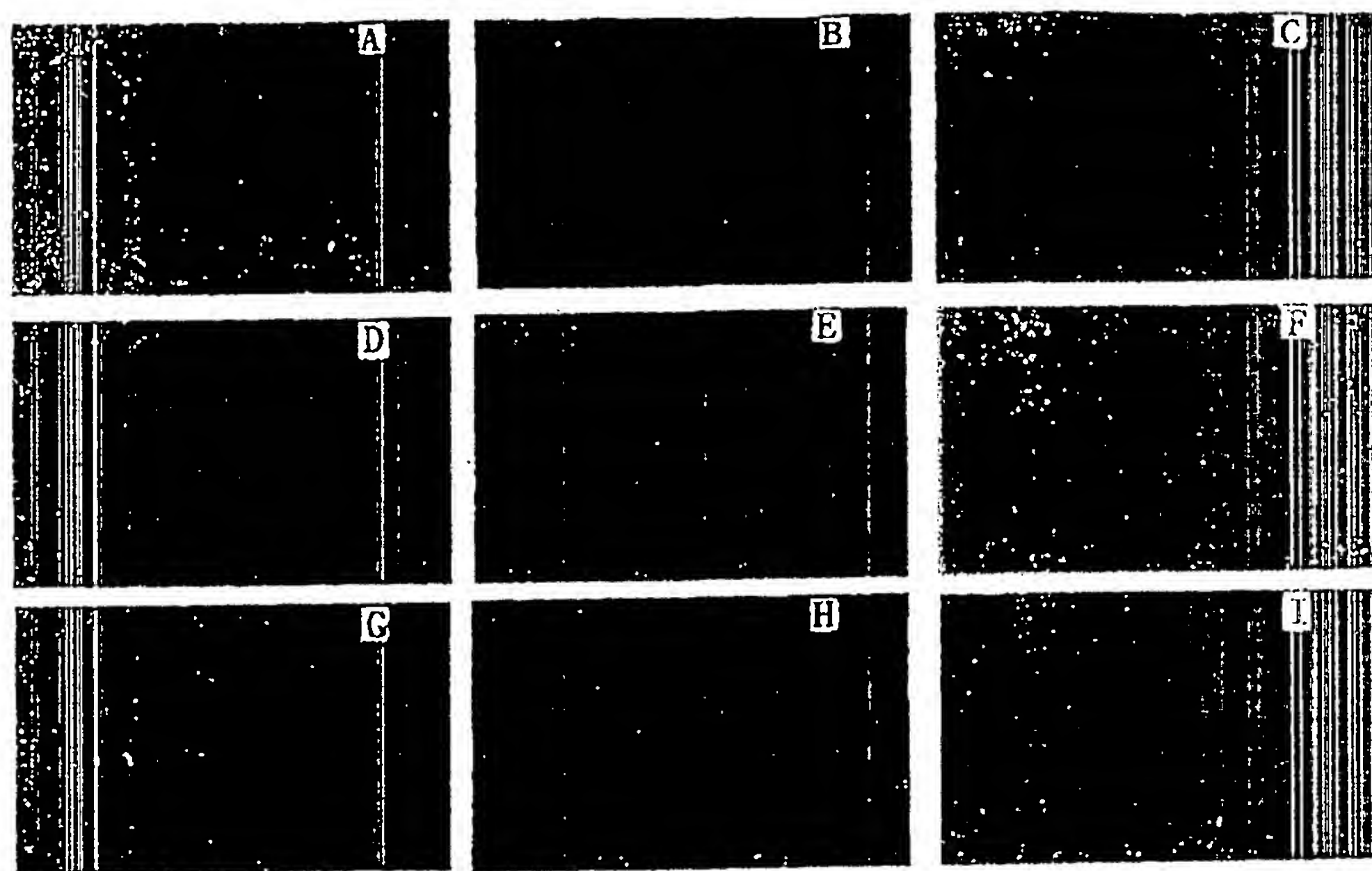


图 18

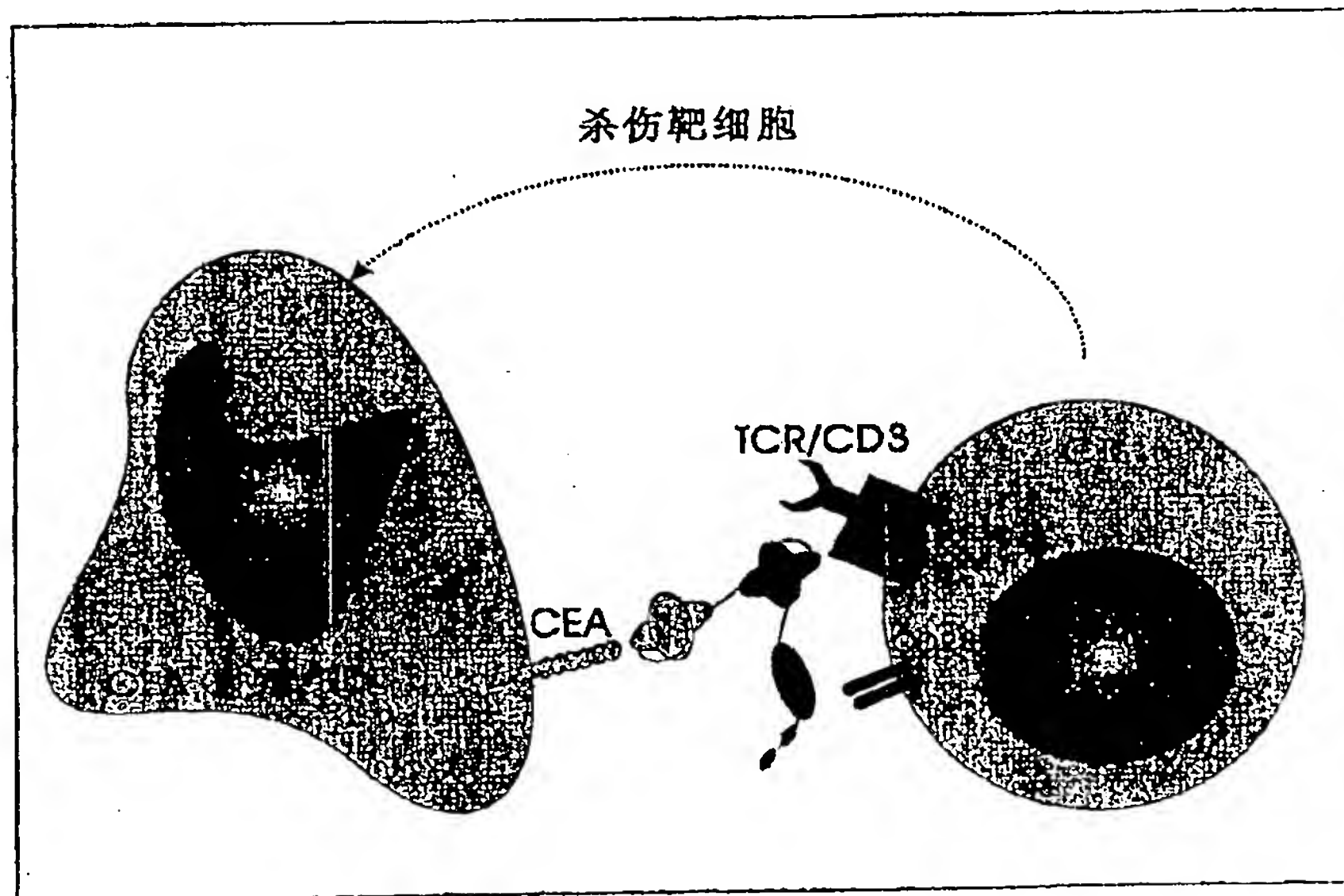
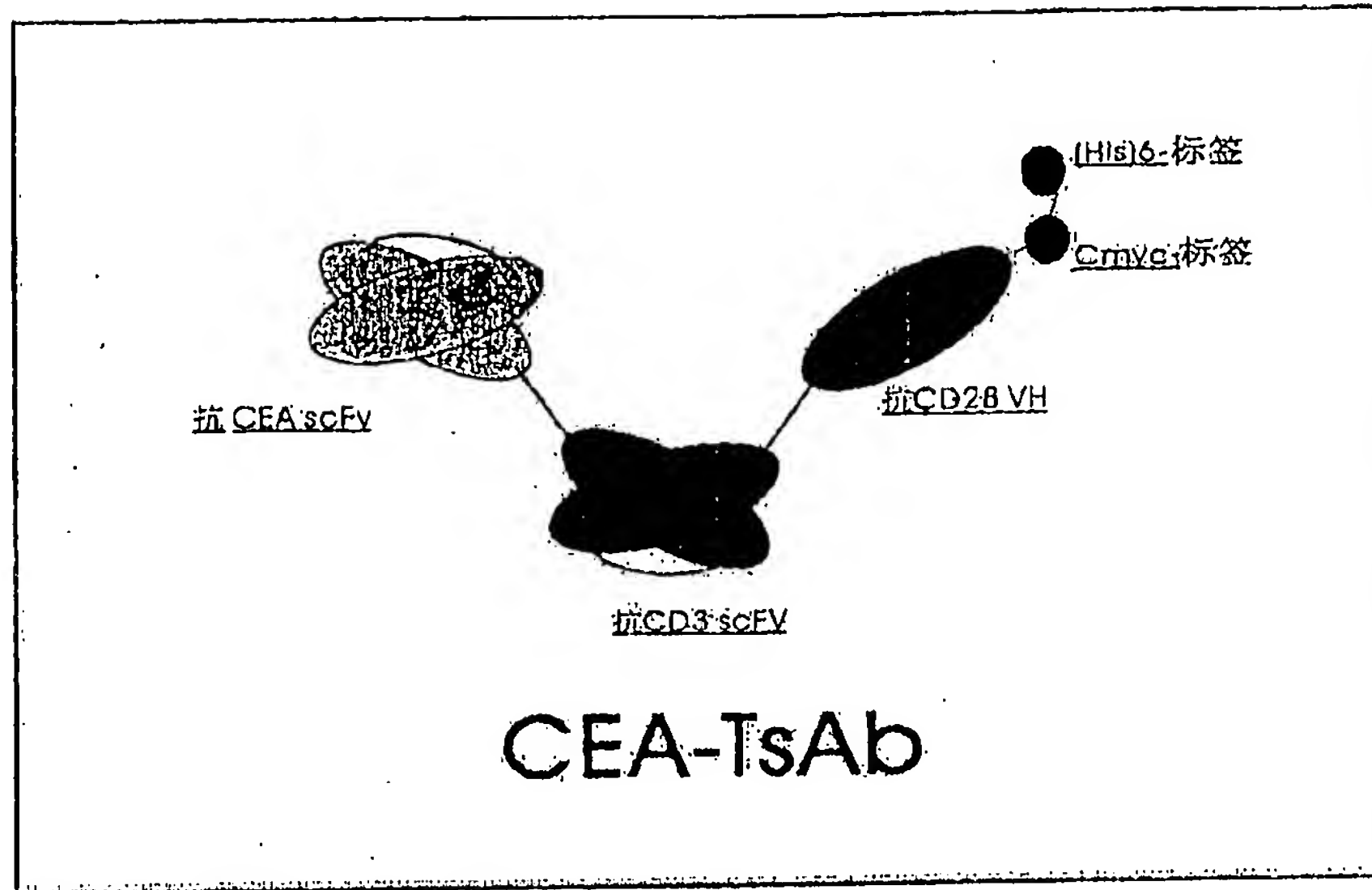


图 19

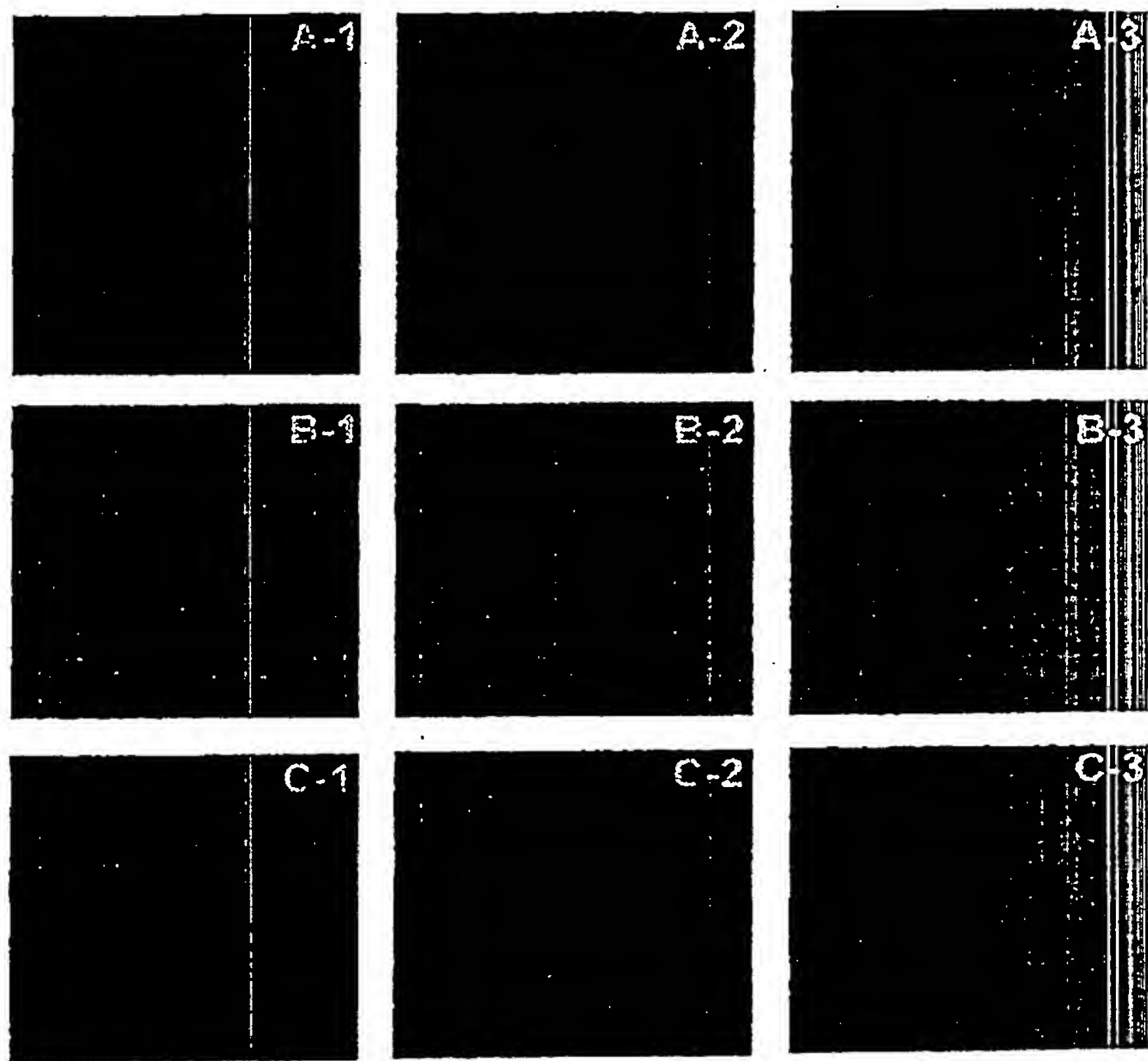


图 20

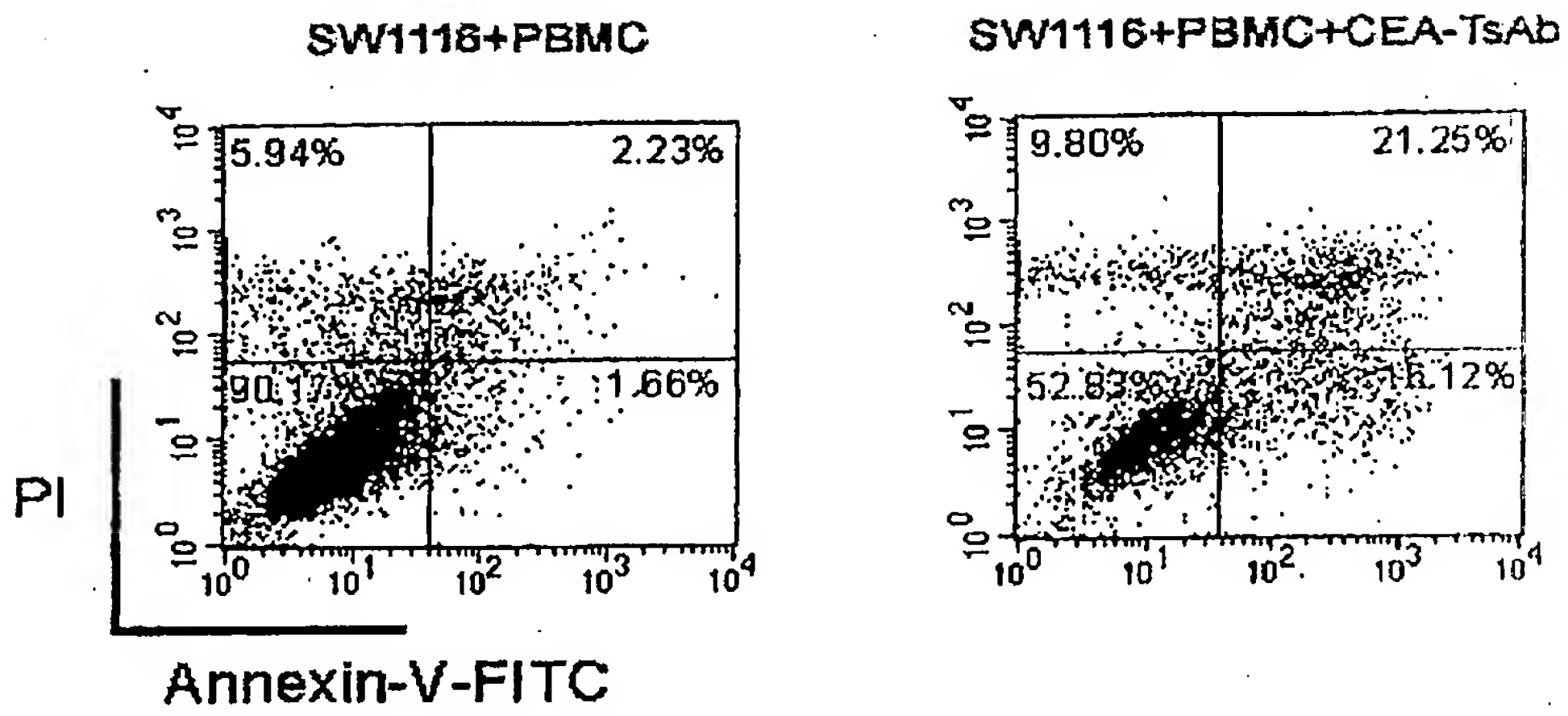


图 21